



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza  
Instituto de Química

**Projeto Final de Curso**  
**IQWX01**

# **PRODUÇÃO DE 1,3- PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR ROTA BIOTECNOLÓGICA**

Germana Breves Rona

Rio de Janeiro  
Outubro/2012

# PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR ROTA BIOTECNOLÓGICA

Germana Breves Rona

PROJETO DE FINAL DE CURSO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE QUÍMICO COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS.

Aprovado por:

---

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc.

---

Sérgio Cantú Mannarino, D.Sc.

---

Prof. Lúcia Moreira Campos Paiva, D.Sc

---

Prof. Paula Fernandes de Aguiar, D.Sc

---

Tatiana Felix Ferreira, M.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
OUTUBRO/2012

Rona, Germana Breves.

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL  
POR ROTA BIOTECNOLÓGICA / Germana Breves Rona – Rio de  
Janeiro: UFRJ/IQ.

Dissertação (Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza,  
Instituto de Química / DBQ, 2012.

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida e Sérgio Cantú Mannarino

1. 1,3 - propanodiol. 2. Glicerol. 3. *Clostridium butyricum*. 4.  
Segregação plasmidial. 5. Planejamento experimental I. Almeida,  
Rodrigo Volcan (Orient.) II. Mannarino, Sérgio Cantú. III.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV.  
Título.

Aos meus avós Maria dos Anjos Fonseca e João de Souza Breves



“Aquilo que hoje se prova, antes foi apenas imaginado”.

(William Blake)

## **Agradecimentos**

---

*Primeiramente agradeço a Deus, pela saúde, força e oportunidade para desenvolver este trabalho.*

*Em especial aos meus tios, Maria do Socorro Moreira e Ivan Moreira, aos meus primos Julio André Moreira Neto e Ivan Moreira Junior, e ao meu padrinho Mário Zilberberg, por todo apoio amor e carinho, que me foram dados, por confiarem nas minhas escolhas e incentivarem a seguir o caminho desejado.*

*Aos orientadores Rodrigo Volcan Almeida e Sérgio Cantú Mannarino por acreditarem na minha capacidade, pela paciência, atenção, ensinamentos e confiança.*

*Aos meus orientadores anteriores, que nunca deixaram de me orientar, Daniel Vidal Perez, Elis Cristina Araujo Eleutherio e Sarai de Alcantara por me orientarem nas pesquisas e fora dos laboratórios, pelo apoio e pela confiança.*

*Aos amigos, colegas e companheiros de bancada do LAMMP por me acolherem de braços abertos, por toda ajuda recebida ao longo dos experimentos e pelos momentos de alegria. É muito bom trabalhar dentro de um grupo tão unido e receptivo.*

*Aos meus amigos do LIFE por toda força, apoio e carinho.*

*A todos os meus amigos que estiveram ao meu lado me apoiando em todos os momentos.*

*Ao meu namorado Leonardo Cardoso Vidal pela paciência, compreensão e carinho.*

*Ao Colégio Teresiano, em especial a Marília Palhares, pela contribuição a minha formação acadêmica e pessoal.*

*Aos laboratórios: Laboratório de Tecnologia Enzimática, Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse, Laboratório de Química de Proteínas/ Unidade Proteômica, Laboratório de Análises Avançadas em Bioquímica e Biologia Molecular e Laboratório de Biotecnologia Microbiana por disponibilizar aparelhos e reagentes sempre que preciso.*

*Ao laboratório BIOSE pela atenção dedicada, pelos ensinamentos e orientações. E pela realização dos experimentos no HPLC.*

*A professora Paula Fernandes de Aguiar por ensinar tudo o que eu sei sobre planejamento experimental.*

*Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, agradeço pelo incentivo e por todas as oportunidades.*

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR ROTA BIOTECNOLÓGICA

ALUNO: Germana Breves Rona

ORIENTADOR: Rodrigo Volcan Almeida, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

CO-ORIENTADOR: Sérgio Cantú Mannarino, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

O 1,3-propanodiol (PDO) é um monômero utilizado na produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos. Como apresenta alto custo de produção, seu uso foi destinado a produção de polímeros especiais que atendem a pequenos mercados. Esta situação adquiriu um novo rumo quando as empresas Shell e DuPont, começaram a comercializar um novo poliéster a base de PDO, o poli (tereftalato de trimetileno). Este apresenta excelentes propriedades, e é adequado para aplicações em fibras e produtos têxteis. Estima-se que a produção anual de PDO irá triplicar no período de 2011 a 2015 (Ferreira, 2011). Uma alternativa a alta demanda da produção de PDO, a baixa seletividade e produção de intermediários tóxicos resultantes de sua síntese por rota química é a fermentação de glicerol por microrganismos (Tang *et al.*, 2009). Nesse contexto, o glicerol aparece como uma matéria-prima promissora na geração de muitos intermediários da indústria química, principalmente em função da crescente produção de biodiesel que vem gerando grandes excedentes de glicerina. O Brasil hoje é considerado um dos maiores produtores e consumidores mundiais de biodiesel.

O objetivo desse trabalho é a obtenção de uma cepa de *Escherichia coli* recombinante, contendo os genes *dhaB1*, *dhaB2* e *dhaT* de *Clostridium butyricum*, que seja capaz de produzir PDO a partir de glicerol, utilizando técnicas de biologia molecular. Também são objetivos deste trabalho analisar a expressão das proteínas recombinantes e a segregação plasmidial; além de estudar a produção de 1,3 - propanodiol empregando ferramentas de planejamento experimental.

O operon de *C. butyricum* foi inserido com sucesso em uma cepa de *E. coli* (JM109), tanto através do vetor pTrc, quanto através do vetor pBAD. As cepas mutantes foram capazes de expressar as três proteínas de interesse, DhaB1 (glicerol desidratase), DhaB2 (ativadora da glicerol desidratase) e DhaT (1,3-PD desidrogenase). O modelo foi validado obtendo-se como ponto de concentração máxima a combinação cuja temperatura é de 23° C e concentração de arabinose é de 0,15%.



## Índice

---

Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas	X
Lista de siglas, abreviaturas e símbolos	XI
Lista de Abreviaturas e Símbolos	
I. Introdução	2
II. Objetivo	4
III. Revisão Bibliográfica	
1. 1,3 – propanodiol	5
2. Aplicações do PDO	5
3. Biodiesel	6
4. Glicerol	8
5. Microrganismos capazes de produzir PDO a partir de glicerol	9
6. <i>Clostridium butyricum</i>	11
7. <i>Escherichia coli</i>	12
8. Engenharia Genética	13
9. Estabilidade Plasmidial	13
10. Planejamento de experimentos em sistemas recombinantes	14
11. Modelo do tipo Doehlert	15
IV. Materiais e Métodos	
IV. I. Materiais	
IV. I. I. Cepas	17
IV. I. II. Plasmídeos	17
IV. I. III. Reagentes	18

IV. I.IV. Equipamentos	18
IV. II. Métodos	
IV. II.I. Biologia Molecular	
1. Célula Eletro Competente	19
2. Manipulação do DNA Plasmidial de Bactéria (miniprep)	19
3. Quantificação do DNA	20
4. Digestão com Enzimas de Restrição	20
5. Eletroforese em Gel de Agarose	21
6. Extração de Fragmentos de DNA de Gel de Agarose	21
7. Trasnformação	22
IV. II.II. Expressão de Proteína	
8. Expressão de Proteína	22
9. Dosagem de Proteína	23
10. Eletroforese em Gel de Acrilamida	24
IV. II.III. Produção de PDO	
11. Massa seca	24
12. Curva de Crescimento	25
13. Planejamento Experimental	25
14. Análise da Segregação Plasmidial	26
15. Indução das Proteínas	27
16. Dosagem do PDO	28
V. Resultados e Discussão.	
IV. I. Biologia Molecular	30
IV. II. Expressão de Proteínas	38
IV. III. produção de PDO	40
VI. Conclusões	51
VII.Referências Bibliográficas	52

## Índice de Figuras

---

<b><u>Figura 1</u></b> - Fórmula estrutural do composto propan-1,3-diol.	5
<b><u>Figura 2</u></b> - Reação do PDO com o ácido tereftálico obtendo-se como produto o poli(tereftalato de trimetileno).	6
<b><u>Figura 3</u></b> - Equação global de transesterificação de triglicerídeos com um álcool monofuncional (metanol ou etanol) gerando glicerol e biodiesel.	7
<b><u>Figura 4</u></b> - Fórmula estrutural do glicerol.	8
<b><u>Figura 5</u></b> – Rota enzimática de produção de 1,3-PDO a partir de glicerol.	9
<b><u>Figura 6</u></b> - Vias bioquímicas de fermentação do glicerol (Biebl <i>et al.</i> , 1999).	10
<b><u>Figura 7</u></b> - Representação gráfica e matriz utilizada para o modelo de Doehlert relativa a um experimento de duas variáveis: $x_1$ (cinco níveis) e $x_2$ (três níveis), no qual há uma triplicata do ponto central, resultando em nove experimentos (Araujo & Janagap, 2012).	16
<b><u>Figura 8</u></b> - Representação esquemática do processo de expressão de proteínas.	23
<b><u>Figura 9</u></b> - Curva analítica de BSA pelo método de Bradford. Concentração de BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) contra abs (595 nm).	24
<b><u>Figura 10</u></b> – Curva de concentração celular ( $\text{mg}/\text{mL}$ ) x Abs 600 nm para quantificação do crescimento celular a partir do fator.	25
<b><u>Figura 11</u></b> - Hexágono relativo à projeção dos pontos em um planejamento experimental do tipo Doehlert utilizando duas variáveis.	26

**Figura 12** - Esquema do procedimento relativo à segregação plasmidial, mostrando após a expressão, as diluições em série, e em seguida o plaqueamento em placa com meio LB sólido, e em meio LB sólido com ampicilina. 27

**Figura 13** - Representação esquemática da indução de expressão de proteínas e sua análise em HPLC. 28

**Figura 14** - (A) Curva analítica a qual é possível converter a área medida referente ao pico de glicerol no cromatograma em concentração (mg/mL) de glicerol. (B) Curva analítica a qual é possível converter a área medida referente ao pico de PDO no cromatograma em concentração (mg/mL) de PDO. 29

**Figura 15** - Operon de *C. butyricum* contendo os genes que codificam as enzimas responsáveis pela conversão de glicerol a 1,3-propanodiol: *dhaB1* (glicerol desidratase), *dhaB2* (ativadora da glicerol desidratase), e *dhaT* (1,3 – propanodiol desidrogenase). 30

**Figura 16** - Mapa do plasmídeo pTrc 99 A com tamanho de 4176 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor trc, sendo induzido por IPTG. 31

**Figura 17** - Mapa do plasmídeo pBSK PDO com tamanho de 7520 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor lac, sendo induzido por IPTG. 32

**Figura 18** - Gel de eletroforese proveniente da digestão de pTrc e pBSK PDO, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SaI*. O gel apresenta o padrão de peso molecular, em seguida o experimento: 1 o qual o vetor pTrc foi digerido apenas com a *EcoRI*, 2 o vetor pTrc foi digerido apenas com a *SaI*, 3 o vetor pTrc foi digerido com ambas as enzimas. Nos experimentos 4,5 e 6 foram feitas as mesmas digestões, porém, utilizando o vetor pBSK PDO. 33

**Figura 19** - Mapa do plasmídeo pBAD-PDO, com tamanho de 8687 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor lac, sendo induzido por arabinose. 35

**Figura 20** - Mapa do plasmídeo pTRC99A-PDO com tamanho de 8785 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor trc, sendo induzido por IPTG. 36

**Figura 21** - Eletroforese em gel de agarose da digestão com *SaI* do pBAD-PDO e pTRC-PDO. 37

**Figura 22** - Eletroforese em gel de acrilamida 12%. Indução do pTRC-PDO com 1mM IPTG; pBAD – PDO com 0,2% L(+) arabinose em aerobiose em meio LB 2 %. Pontos: sem indução, 1h de indução e 4 h de indução. 38

**Figura 23** - Eletroforese em gel de acrilamida 12%: (B) Indução do pTRC-PDO com 40 mM lactose; pBAD – PDO com L(+) arabinose em microaerobiose em meio LB 2 % com glicerol. Pontos sem indução e após 4h de indução. 39

**Figura 24** - Curva de crescimento celular. 40

**Figura 25** - Superfícies referentes ao ponto de 18 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_x/s$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_p/s$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas. 43

**Figura 26** - Superfícies referentes ao ponto de 24 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_x/s$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_p/s$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas. 44

**Figura 27** - Superfícies referentes ao rebatimento do ponto de 18 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_x/s$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_p/s$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas. 46

**Figura 28** - Superfícies referentes ao rebatimento do ponto de 24 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_x/s$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_p/s$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas. 47

## Índice de Tabelas

---

**Tabela 1** - vetores utilizados nesse trabalho, com seus respectivos vetores, gene de controle e fonte. 17

**Tabela 2** - Protocolo de digestão dos plasmídeos pTrc e pBSK PDO, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*, em banho a 37° C, *overnight*. 21

**Tabela 3** - Protocolo de digestão dos plasmídeos pBAD PDO e pTrc PDO, com a enzima de restrição *Sall*, em banho a 37° C, *overnight*. 21

**Tabela 4** - Pontos do planejamento experimental do tipo Doehlert utilizando duas variáveis. 26

**Tabela 5** - Planejamento experimental do tipo Doehlert aplicada a otimização da produção de PDO. 42

**Tabela 6** - Novo planejamento experimental do tipo Doehlert aplicada a otimização da produção de PDO. 45

**Tabela 7** - Modelo referente a cada superfície traçada acima (  $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$  ).  $X_1$  é a concentração de arabinose e  $X_2$  é a temperatura. 48

**Tabela 8** - Resultados de rendimento (%) de PDO e produção de PDO, referentes aos pontos de 18h e 24h, e seus rebatimentos. 49

## *Lista de siglas, abreviaturas e símbolos.*

---

<b>3-HPA</b>	3-hidroxipropionaldeído
<b>abs</b>	Absorbância
<b>B12</b>	Cobalamina
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino
<b>dhaB</b>	Glicerol desidratase
<b>dhaB1</b>	Glicerol desidratase
<b>dhaB2</b>	Ativadora da glicerol desidratase
<b>dhaT</b>	1,3-propanodiol desidrogenase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -Dtiogalactopiranosídeo
<b>IQ</b>	Instituto de química
<b>IR</b>	Infravermelho
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LaMMP</b>	Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBT</b>	Poli (tereftalato de butileno)
<b>PDO</b>	1,3-propanodiol
<b>PET</b>	Poli (tereftalato de etileno)
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PTT</b>	Poli (tereftalato de trimetileno)
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Yp/s</b>	Rendimento produção em relação ao substrato
<b>Yx/p</b>	Rendimento biomassa em relação à produção
<b>Yx/s</b>	Rendimento biomassa em relação ao substrato



## I. Introdução

---

O 1,3-propanodiol (PDO) é um diol contendo três átomos de carbono em sua estrutura. É um monômero utilizado na produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos. Como apresenta alto custo de produção, seu uso foi destinado a produção de polímeros especiais que atendem a pequenos mercados. Esta situação adquiriu um novo rumo quando as empresas Shell e DuPont, começaram a comercializar um novo poliéster a base de PDO, o poli (tereftalato de trimetileno) (PTT). Este apresenta excelentes propriedades, e é adequado para aplicações em fibras e produtos têxteis. Além disso, tem a capacidade de substituir o tradicional poli (tereftalato de etileno) (PET) e poli (tereftalato de butileno) (PBT) (Zeng & Biebl, 2002). O PDO possui também uma série de outras aplicações interessantes (Barbirato *et al.*, 1998), como síntese de solventes, adesivos, laminados, resinas, cosméticos, detergentes e medicamentos (Kaur *et al.*, 2012). Segundo o último relatório SBI Energia do Mercado Mundial de Produtos Químicos *Biorenewable* (2010), a produção anual de PDO irá triplicar no período de 2011 a 2015 (Ferreira, 2011). A alta demanda da produção de PDO,  $10^5$  toneladas ao ano, e a baixa seletividade e produção de intermediários tóxicos resultantes de sua síntese por rota química, provocaram grande aumento nas pesquisas relativas ao aumento da produção de PDO utilizando processos mais limpos. Uma alternativa é a fermentação de glicerol por micro organismos como: *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Clostridium butyricum* (Tang *et al.*, 2009). Nesse contexto, o glicerol aparece como uma matéria-prima promissora na geração de muitos intermediários da indústria química, principalmente em função da crescente produção de biodiesel que vem gerando grandes excedentes de glicerina. De acordo com a norma da estabelecida pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), desde 2010, é obrigatória a presença de 5% de mistura de biodiesel no diesel comercializado no território brasileiro. O Brasil hoje é considerado um dos maiores produtores e consumidores mundiais de biodiesel. O aumento no consumo proporciona para o Brasil, uma diminuição da importação do diesel derivado do petróleo, além da redução das emissões veiculares (ANP, 2012).



## II. Objetivo

---

O objetivo desse trabalho é a obtenção de uma cepa de *Escherichia coli* recombinante, contendo os genes *dhaB1*, *dhaB2* e *dhaT* de *Clostridium butyricum*, que seja capaz de produzir PDO a partir de glicerol. São objetivos também deste trabalho analisar a expressão das proteínas recombinantes e a segregação plasmidial; além de estudar a produção de 1,3-propanodiol empregando ferramentas de planejamento experimental.

### III. Revisão Bibliográfica

---

#### 1. 1,3-Propanodiol (PDO)

O propan-1,3-diol, também conhecido como trimetilenoglicol ou 1,3-di-hidroxiopropano, é um diol contendo três átomos de carbono em sua estrutura como mostra a Figura 1. Em condições normais de temperatura e pressão, o propan-1,3-diol é um líquido viscoso, transparente e incolor, miscível com água e com etanol (Ferreira, 2011).



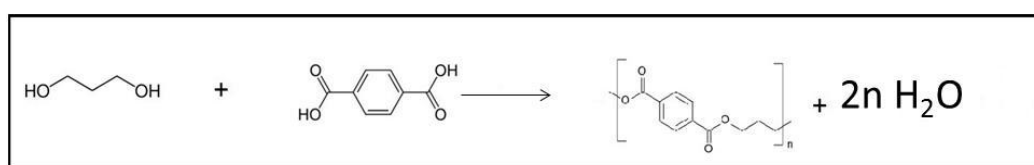
Figura 1- Fórmula estrutural do composto propan-1,3-diol.

Uma das formas de sua produção é pela rota química. Entre as principais rotas sintéticas destacam-se: a conversão de acroleína a PDO (Dupont) e a conversão de óxido de etileno a PDO (Shell). Esses processos, porém, apresentam grandes desvantagens; como a utilização de intermediários tóxicos e alto custo dos equipamentos utilizados. Essas dificuldades podem ser evitadas pelo desenvolvimento de uma rota biotecnológica utilizando micro organismos recombinantes (Wilkins *et al.*, 2012).

#### 2. Aplicações do PDO

Durante muito tempo o PDO foi considerado uma espécie química com alto custo de produção e com um campo de aplicação muito restrito (Pflügl *et al.*, 2012). Contudo, é um composto orgânico versátil que ultimamente vem ganhando importância devido ao seu uso como base para um novo poliéster chamado tereftalato de politrimetileno o qual possui muitas aplicações, como roupas, fibras e revestimentos de carro (Kaur *et al.*, 2012). Este copolímero a base de PDO, comercializado pela Shell e DuPont, denominado PTT (Shell) ou 3GT (DuPont), é produto da condensação entre o 1,3-propanodiol e o ácido

tereftálico, como mostra a figura 2. Apresenta excelentes propriedades, tais como boa elasticidade, elevada resistência e baixa geração de eletricidade estática. Sendo particularmente adequado para aplicações em fibras e produtos têxteis. Além disso, é um plástico de engenharia muito promissor, tendo capacidade de substituir o tradicional poli (tereftalato de etileno) (PET) e poli (tereftalato de butileno) (PBT) (Zeng & Biebl, 2002). O PDO também é utilizado na síntese de solventes, adesivos, laminados, resinas, cosméticos, detergentes e medicamentos (Kaur *et al.*, 2012).

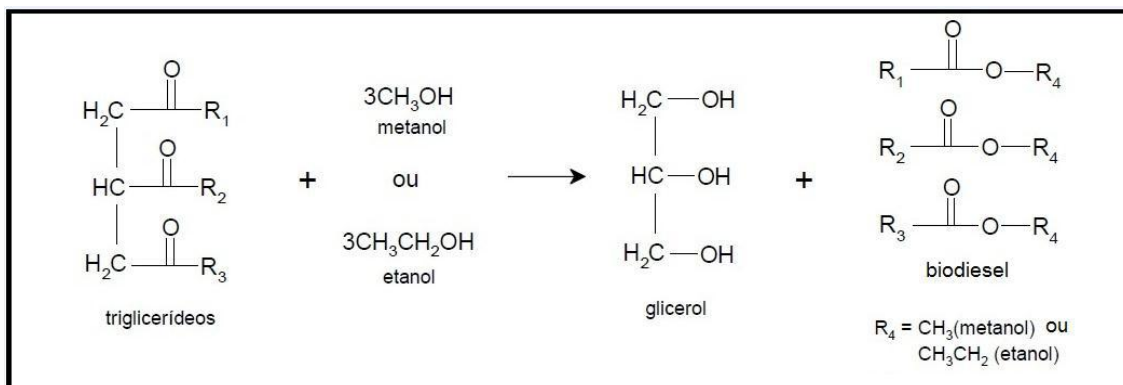


**Figura 2: Reação do PDO com o ácido tereftálico obtando-se como produto o poli(tereftalato de trimetileno).**

Devida à alta demanda da produção de PDO ocorreu um aumento nas pesquisas biotecnológicas, as quais utilizam principalmente *Escherichia coli* como organismo recombinante. Atualmente, a fonte de carbono utilizada para produzir PDO industrialmente é a glicose. O glicerol, porém, foi descrito, há mais de cem anos, como fonte natural de carbono para produção de PDO através da sua fermentação por microrganismos (Pflügl *et al.*, 2012).

### 3. Biodiesel

O biodiesel é produzido a partir da transesterificação de triglicerídeos com um álcool monofuncional (metanol ou etanol) que gera ésteres e glicerol, como mostra a Figura 3.



**Figura 3: Equação global de transesterificação de triglicerídeos com um álcool monofuncional (metanol ou etanol) gerando glicerol e biodiesel.**

A produção de biodiesel tem crescido muito nos últimos anos. A rápida expansão da capacidade de produção está sendo observada não só nos países desenvolvidos como Alemanha, Itália, França e Estados Unidos, mas também em países em desenvolvimento como o Brasil, Argentina, Indonésia e Malásia (Amaral *et al.*, 2009).

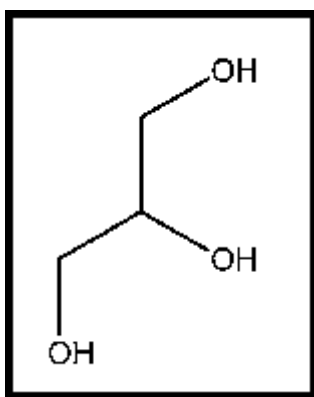
Nos Estados Unidos a produção de biodiesel cresceu de 112 milhões de galões em 2005, para 315 milhões de galões em 2010. A meta para de 2012, é de produzir um bilhão de galões de biodiesel, apenas nos Estados Unidos. Até 2019, a expectativa é que a produção mundialmente atinja 10 bilhões de galões produzidos mundialmente, aumentando ainda mais a oferta de glicerol bruto (Nicol *et al.*, 2012).

Muitos contaminantes tornam esse subproduto da produção de biodiesel impróprio para aplicações na indústria química e farmacêutica sem a realização de um tratamento prévio. Assim, o glicerol bruto termina sendo desperdiçado, visto que o mercado brasileiro não é capaz de absorvê-lo. Por isso, é importante o desenvolvimento de novas e sustentáveis técnicas para utilização da glicerina (Ferreira, 2011; Jensen, *et al.*, 2012).

Uma aplicação para este excedente de glicerina é sua utilização como matéria-prima, em bioprocessos, na produção de alguns produtos com importância comercial como biossurfactantes e ácidos orgânicos, visando redução dos custos de produção (Amaral *et al.*, 2009).

#### 4. Glicerol

O Glicerol, também conhecido como propano-1,2,3-triol, é um composto orgânico que pertence à função álcool. É um líquido a temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O termo glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95 %. A Figura 4 apresenta a estrutura do glicerol (Ferreira, 2011).



**Figura 4: Fórmula estrutural do glicerol.**

O Glicerol é uma molécula industrialmente importante principalmente no ramo de alimentos, cosméticos, plásticos e farmacêuticos. As principais fontes produtoras de glicerol são as sínteses químicas e a purificação de glicerol bruto como coproduto da produção de biodiesel (Nicol *et al.*, 2012).

A rota química mais importante para a síntese de glicerol é a cloração de propileno seguido de reações que produzem cloreto de alila, dicloridrina e epicloridrina. Em seguida, a epicloridrina é hidrolisada por uma solução cáustica a glicerol. O alto custo relativo aos precursores petroquímicos e a energia utilizados na rota sintética do glicerol não tornam esse processo economicamente viável frente ao baixo preço do glicerol bruto (Nicol *et al.*, 2012). Na produção de biodiesel, para cada 100 kg de biodiesel produzido, são obtidos de 10 a 12 kg de glicerina (Pflügl *et al.*, 2012), tornando-o um excedente e baixando seu preço no mercado (Arasu *et al.*, 2011). O consumo anual de glicerol atualmente atinge mais de 1.000.000,00 toneladas (Nicol *et al.*, 2012).

O glicerol bruto apresenta impurezas e não pode ser utilizado diretamente na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosmético antes de passar por um processo de purificação, que apresenta alto custo. A conversão deste em outros produtos químicos, como 1,3-propanodiol, ácido 3-hidroxi propionico e 1,3-dihidroxicetona, por uma rota biotecnológica, uma via renovável, limpa e ambientalmente favorável, estimula economicamente a produção do biodiesel e o desenvolvimento de processos biotecnológicos (Kaur *et al.*, 2012; Arasu *et al.*, 2011).

##### 5. Microrganismos capazes de produzir PDO a partir de glicerol

Muitos microrganismos são capazes de fermentar glicerol produzindo 1,3-PDO. Dentre estes se encontram os do gênero *Klebsiella*: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *K. planticola*; do gênero *Citrobacter*: *C. freundii*, *C. intermedium* e *C. amalonaticus*; do gênero *Lactobacillus*: *L. reuteri*, *L. buchneri* e *L. brevis*, e do gênero *Clostridium*: *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii* e *C. kainantoi*. Além destes, outros microrganismos também apresentam tal capacidade: *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*; *Acetobacterium carbinolicum*, *A. woodii*; *Bacillus sp*; *Pelobacter venetianus* e *Ilybacter polytropus*. Porém os microrganismos mais estudados para a conversão de glicerol em PDO são *K. pneumoniae*, *C. freundii*, e *C. butyricum* (Ferreira, 2011).

A análise dos produtos da fermentação mostra que parte do glicerol é convertida nos mesmos produtos da fermentação do açúcar. Liberando assim energia, utilizada no crescimento, e equivalentes redutores, utilizados na redução do glicerol a PDO. (Biebl *et al.*, 1999).

O glicerol é convertido a PDO através de duas etapas, como mostra a figura 5.

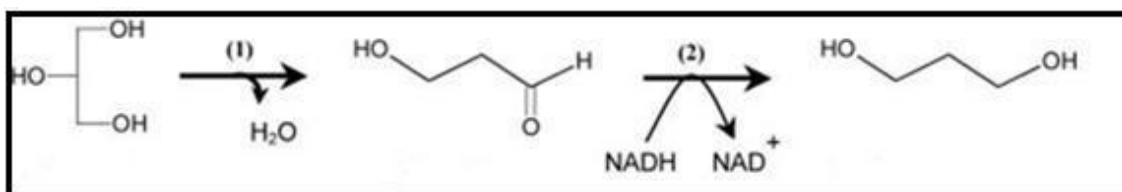


Figura 5: Rota enzimática de produção de 1,3-PDO a partir de glicerol.



Na primeira, a glicerol desidratase (DhaB) catalisa a remoção de uma molécula de água do glicerol, produzindo 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA). Na segunda, a enzima 1,3-propanodiol oxidoreductase (DhaT) reduz o 3-HPA a PDO simultaneamente à oxidação da forma reduzida do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para sua forma oxidada, NAD<sup>+</sup> (Nakamura & Whited, 2003). O poder redutor é gerado no metabolismo do glicerol, que faz uso das reações da glicólise e resulta na formação de subprodutos (Biebl, 2001). Como é apresentado na Figura 6.

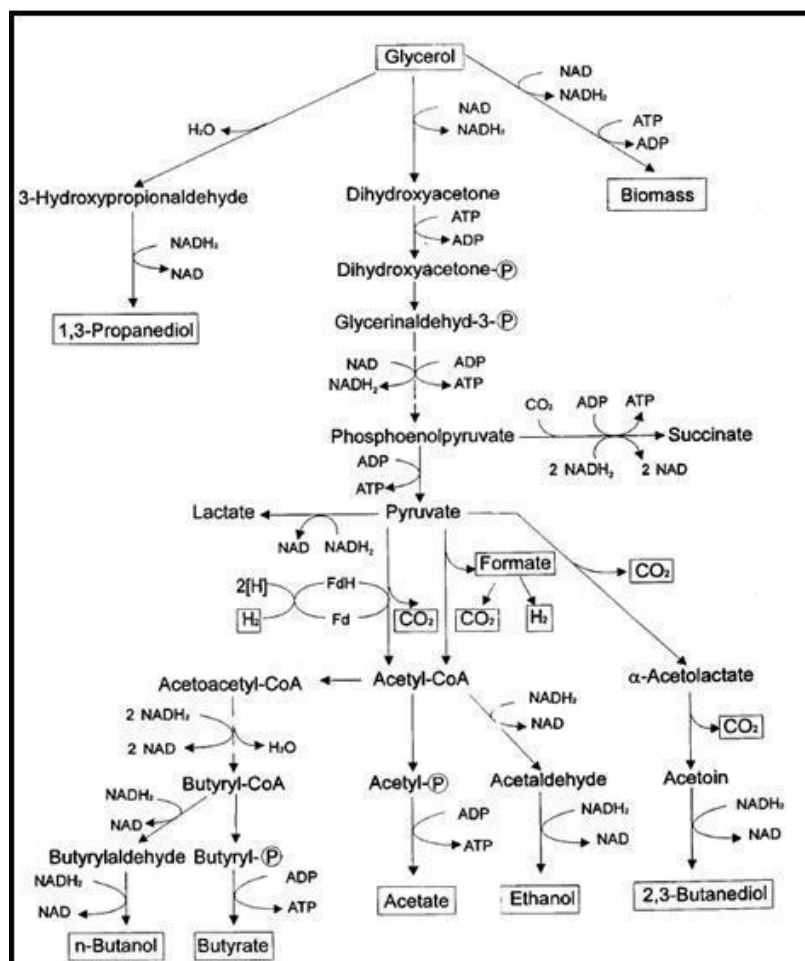


Figura 6: Vias bioquímicas de fermentação do glicerol (Biebl *et al.*, 1999).

A desidratação do glicerol a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) é catalisada na maior parte dos microrganismos por uma enzima dependente de vitamina B12 e a redução posterior de 3-HPA a PDO é catalisada por uma enzima NADH-dependente (O'Brien *et al.*, 2004).

As enzimas glicerol e diol desidratases B12-dependente possuem uma rápida inativação mediante a presença de elevada quantidade de glicerol. Essa limitação é superada pela adição de quantidades excessivas de vitamina B12 no meio de cultivo (O'Brien *et al.*, 2004), o que aumenta relativamente o custo da produção. Outra característica importante desta enzima é sua sensibilidade ao oxigênio (O'Brien *et al.*, 2004; Raynaud *et al.*, 2003). Uma grande vantagem da espécie *C. butyricum* é que a glicerol desidratase que atua na conversão de glicerol a 3-HPA é B12 independente (O'Brien *et al.*, 2004).

## 6. *Clostridium butyricum*

*Clostridium* é um gênero de bactérias gram-positivas da família Clostridiaceae. A maioria das espécies desse gênero cresce somente na ausência completa de oxigênio. Normalmente, são encontradas no solo, água e no trato intestinal dos humanos e outros animais. Células em estado de latência são altamente resistentes à dessecação, calor e substâncias químicas tóxicas e detergentes (Ferreira, 2011).

*Clostridium butyricum* apresenta-se na forma de bastonetes e com tamanho variando de 0,6 µm de largura a 3-7 µm de comprimento. São móveis e têm a capacidade de formar esporos, o que garante sua sobrevivência em condições adversas durante longos períodos de tempo (Ferreira, 2011).

*Clostridium butyricum* ao fermentar glicose produz butirato, acetato, lactato e hidrogênio molecular. Quando a fonte de carbono encontrada no meio é glicerol, tem-se 1,3-propanodiol como produto principal do metabolismo (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1998; Saint-Amans *et al.*, 2001).

*Clostridium butyricum* apresenta um operon, contendo os genes *dhaB1*, *dhaB2*, e *dhaT*, responsável pela conversão de glicerol a PDO. Uma grande vantagem econômica, apresentada por esta espécie, é que a enzima glicerol desidratase é independente da coenzima B12 (O'Brien *et al.*, 2004; Raynaud *et al.*, 2003).

*C. butyricum* quando cultivada em meio na qual a única fonte de carbono é glicerol pode atingir uma produção de 94 g/L de PDO (Pflügl *et al.*, 2012).

## 7. Escherichia coli

*Escherichia coli* é um bastonete gram-negativo anaeróbio facultativo, não formador de esporos. Fermenta lactose e outros açúcares, produzindo indol e triptofano. Pertence à família *Enterobacteriaceae*, que inclui outros gêneros de importância médica como *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Yersinia* spp. Geralmente mede entre 1 a 3 µm de largura por 0,5 µm de diâmetro. Apresenta apêndices de superfície, incluindo *pili* e flagelos, que podem ser numerosos (Ferreira, 2011).

O citoplasma das enterobactérias, como o de outras bactérias, não contém organelas delimitadas por membrana e seu genoma, usualmente, consiste de um cromossomo circular e pode incluir múltiplos plasmídeos de diferentes tamanhos, dispersos pelo citoplasma. As enterobactérias possuem uma membrana interna (ou citoplasmática) e uma membrana externa composta por fosfolipídios, entre elas há um espaço periplasmático que contém a parede celular de peptideoglicanas (Ferreira, 2011).

*E. coli* é um dos mais utilizados sistemas de expressão de proteínas recombinantes, inclusive em escala comercial (Baneyx, 1999; Terpe, 2006), isto porque, além de oferecer vantagens, como a capacidade de crescer rapidamente em altas concentrações celulares e em substratos baratos, possui genética bem caracterizada e existem vários vetores e cepas mutantes disponíveis comercialmente (Baneyx, 1999; Peti & Page, 2007). Além disso apresenta um conjunto de ferramentas prontamente disponíveis para a manipulação genética. Sendo assim, a *E. coli* tem sido um hospedeiro adequado para ser utilizada em escala laboratorial e industrial, com a finalidade de produzir valiosos metabólitos (Atsumi *et al*, 2008).

O uso de glicerol como principal fonte de carbono no processo de fermentação por *E. coli*, pode ser prejudicada, devida a sua incapacidade de fermentar glicerol na ausência de um acceptor externo de elétrons. Um desenvolvimento mais recente na fermentação microbiana de glicerol mostrou a capacidade de *E. coli* em fermentar tal substrato por via anaeróbia (Dharmadi *et al.*, 2006). Dharmadi e colaboradores mostraram que em anaerobiose a *E. coli* é capaz de realizar tal fermentação devida a presença de CO<sub>2</sub> proveniente da oxidação do formiato.

## 8. Engenharia Genética

A engenharia genética consiste na manipulação de genes, também conhecida como tecnologia do DNA recombinante. Genes, fragmentos de DNA, são introduzidos em um hospedeiro através de um vetor. O DNA exógeno é então replicado e transmitido para as células filhas juntamente com o resto do DNA do hospedeiro, que adquire as novas características.

A biotecnologia tem sido utilizada para produção de substâncias importantes como insulina, fatores de crescimento e anticorpos (Walsh, 2005; Graumann & Premstaller, 2006).

O advento da técnica do DNA recombinante permitiu modificar vias metabólicas, através de modificações genéticas de alvos específicos.

## 9. Estabilidade plasmidial

Durante a produção de proteínas recombinantes uma das questões fundamentais é a estabilidade plasmidial, principalmente durante o escalonamento do processo ou produção industrial (Gupta *et al.*, 1995). A estabilidade do plasmídeo é caracterizada em dois tipos: a estrutural e a segregacionista. A instabilidade estrutural é o resultado de alterações estruturais no plasmídeo durante o cultivo, como alterações da sequência de nucleotídeos de um plasmídeo, inserções, deleções ou rearranjos no DNA plasmidial. Já a segregação plasmidial é a perda do plasmídeo durante a divisão celular, resultando em uma das células filha sem o plasmídeo (Gupta *et al.*, 1995; Friebs, 2004). Na maioria das vezes, a expressão “instabilidade plasmidial” se refere à segregação plasmidial. A replicação correta dos plasmídeos durante a divisão celular é um problema central em sistemas recombinantes. A taxa de crescimento específico de células sem plasmídeo é maior quando comparado à de células com plasmídeo, logo, se houver algumas células sem plasmídeo no início do cultivo, estas células crescerão mais que as células com plasmídeo e se tornarão dominantes no cultivo, levando a culturas mistas. Desta forma, a produtividade da proteína recombinante será drasticamente afetada (Friebs, 2004). Segundo Friebs (2004), a segregação plasmidial é tão importante que, sem um estudo para determiná-la no processo em questão, nenhuma conclusão real pode ser feita

sobre a produtividade da proteína recombinante. Muitos fatores podem influenciar a estabilidade plasmidial. Alguns destes fatores são a taxa de crescimento celular, o número de cópias do plasmídeo, o tamanho do inserto do plasmídeo, o nível de expressão da proteína recombinante, a toxicidade da proteína recombinante, a formulação do meio de cultivo, a concentração de oxigênio dissolvido, o pH, a temperatura e o modo de operação do cultivo (Gupta *et al.*, 1995; Friehs, 2004; Larentis *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). A temperatura também afeta a estabilidade plasmidial, já que esta afeta a taxa de crescimento celular, as rotas metabólicas e os sistemas regulatórios (Larentis *et al.*, 2006). A indução da expressão da proteína sempre diminui a estabilidade plasmidial, provavelmente devido aos efeitos tóxicos da proteína para a célula (Friehs, 2004; Larentis *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Quando o nível de expressão é aumentado, a estabilidade plasmidial tende a diminuir e isto pode ser ocasionado pela repressão da replicação (Larentis *et al.*, 2006). Os dados mostrados por Xu e colaboradores (2006) indicam que a instabilidade plasmidial é muito mais dependente da indução em si do que da presença do antibiótico (pressão seletiva). Além disso, o modo de indução do promotor também tem grande influência sobre a estabilidade. Por exemplo, sabe-se que a indução com IPTG apresenta maior taxa de perda do plasmídeo que aquela feita com lactose (Friehs, 2004).

#### 10. Planejamento de experimentos em sistemas recombinantes

As variáveis que influenciam na expressão de proteínas recombinantes são numerosas e interagem umas com as outras. A estratégia normalmente aplicada na área para avaliar os fatores que influenciam o processo é variar um fator por vez mantendo os demais constantes (Swalley *et al.*, 2006). No entanto, esta estratégia pode não ser eficiente, não permitindo avaliar as interações entre as variáveis do processo e acarretando em um número maior de experimentos. As técnicas de planejamento de experimentos reduzem o número de experimentos envolvidos, diminuem o tempo gasto e o custo final do processo, melhoram a qualidade das informações obtidas, permitem analisar os fatores simultaneamente e suas interações, avaliar os erros experimentais e ainda aperfeiçoar mais de uma variável ao mesmo tempo (Rodrigues & Iemma,

2005). O planejamento de experimentos tem sido aplicado muito recentemente na avaliação e otimização da expressão de proteínas recombinantes em bactérias. Esta técnica ainda não é um procedimento usual para avaliação dos fatores envolvidos no processo de produção de proteína recombinantes, e seu potencial pode ser mais explorado para a avaliação da composição dos meios de cultura (Nikerel *et al.*, 2005; Nikerel *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006) e para as variáveis envolvidas na indução, como temperatura, tempo pós-indução, concentração celular, concentração do indutor e cepa empregada na expressão (León *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006; Swalley *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2007).

#### 11. Modelo do tipo Doehlert

O modelo do tipo Doehlert era um modelo pouco conhecido, porém muito útil. Descreve modelo esférico experimental com menos pontos do que os modelos mais utilizados, enfatizando o preenchimento uniforme do espaço. A principal vantagem desse modelo, além de reduzir o número de experimentos, é o fato de se os níveis das variáveis escolhidas não forem adequados, pois não proporcionam a obtenção de um ponto de máximo ou de mínimo requerido, os resultados do primeiro experimento podem ser utilizados no modelo seguinte, reduzindo ainda mais a quantidade de experimentos a serem realizados posteriormente. Neste modelo o número de níveis de uma variável é diferente do número de níveis das outras variáveis (Zolgharnein *et al.*, 2008). Por exemplo, para um planejamento com 3 variáveis, a variável mais importante apresenta sete níveis ( $x_3$ ), a variável de segunda maior importância apresenta cinco níveis ( $x_1$ ) e a variável de terceira maior importância apresenta três níveis ( $x_2$ ) (Araujo & Janagap, 2012).

Quando o modelo apresenta duas ou três variáveis o número total de experimentos é de sete ou treze ensaios respectivamente. A localização espacial desses pontos são sobre os vértices de um cuboctaedro e um hexágono, ambos com um ponto central. A Figura 7 apresenta a representação gráfica a matriz utilizada para o modelo (Araujo & Janagap, 2012):

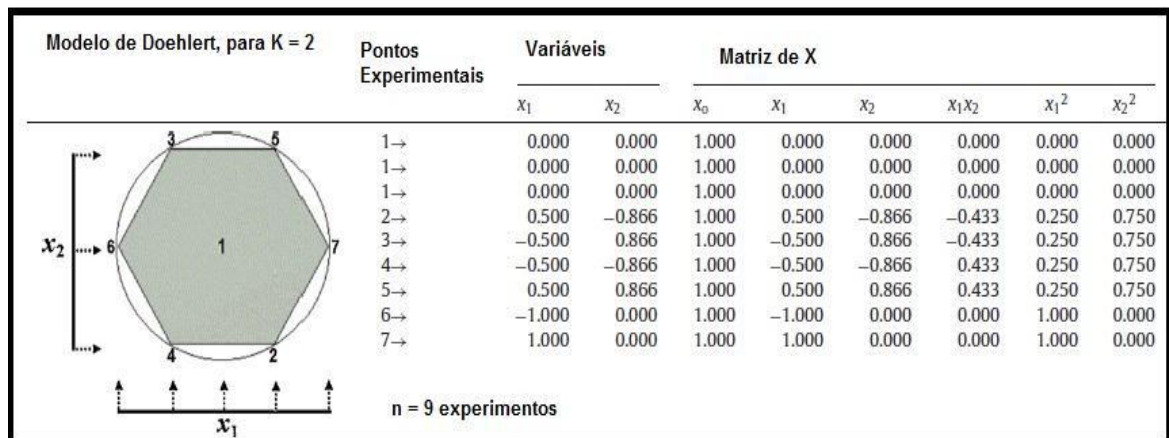


Figura 7: Representação gráfica e matriz utilizada para o modelo de Doehlert relativa a um experimento de duas variáveis:  $x_1$  (cinco níveis) e  $x_2$  (três níveis), no qual há uma triplicata do ponto central, resultando em nove experimentos (Araujo & Janagap, 2012).

## IV. Materiais e Métodos

### IV. I) Materiais:

#### IV. I. I) Cepa:

- *Escherichia coli* JM109 (genótipo: *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>I</sup> lacZΔM15]*), do banco de cultura do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas LaMMP / IQ / UFRJ.
- *Escherichia coli* BL21 (genótipo: *F– ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm*), do banco de cultura do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas LaMMP / IQ / UFRJ.

#### IV.I. II) Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nesse trabalho estão descritos na Tabela 1:

**Tabela 1: vetores utilizados nesse trabalho, com seus respectivos vetores, gene de controle e fonte.**

Nome	Promotor	Gene sob controle	Fonte
pTrc	trc	-	LaMMP
pBSK PDO	lac	Operon PDO	Epock Biolabs
pBAD PDO	ara	Operon PDO	Epock Biolabs
pTrc PDO	trc	Operon PDO	LaMMP



#### IV. I. .III) Reagentes:

- Agarose (Sigma)
- Água: miliQ
- Antibiótico: ampicilina (Sigma)
- Brometo de etídio (Promega)
- BSA (BioRad)
- Enzima de Ligação: T4 DNA Ligase, 5 u/μl (Fermentas).
- Enzimas de Restrição: *EcoRI* (Fermentas)  
*SaI* (Fermentas)
- Glicerol (Vetec)
- Indutor: L- arabinose (Sigma-Aldrich)
- Meio de cultura: *LB Broth Base* (Sigma)  
Agar (Vetec)
- Padrão de peso molecular: Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
- Reagente de Bradford (BioRad)
- Tampão: Tango (Fermentas)  
Loading Dye (Qiagen)

#### IV. I. IV) Equipamentos:

- Balança → analítica (Mettler Toledo – Al 204)
- Banho (FANEM – MOD 100)
- Centrífugas → bancada (Eppendorf – minispinplus)  
→ Eppendorf (Sorvall-pico)  
→ Refrigerada (Sorvall legend RT +)
- Cubas (BioRad – Power Pac Basic)
- Eletroporador (BioRad – Micro Pulser)
- Espectrofotômetro → BioRad – Smart SpecPlus  
→ Pharmacia Biothec- ultraspec 3000
- Espectrofotômetro de micro placas: BioTek PowerWave XS
- Estufa (SPLabor – SP200)

- Fluxo Laminar (Pachane – Pa 400)
- Foto documentador (Dnr - mini bis pro)
- Freezer (-80° C) (New Brunswick Scientific (U410 premium)
- Shaker → New Brunswick Scientific – Innova 4340

→ New Brunswick Scientific – Innova 42

→ New Brunswick Scientific – Innova 44

- Sonicador (SONICS – vibracell)

#### **IV. II Métodos:**

##### **IV. II. I) Biologia Molecular:**

###### **1. Células eletro competentes (JM109)**

As células de *E. coli* (JM109), coletadas diretamente do estoque, congeladas a -80 ° C, foram inoculadas, *overnight*, 20 µL em 6,0 mL de meio LB 2%. As células foram re-inoculadas em 500 mL de meio LB 2 % até chegar a uma D.O. a 600 nm de aproximadamente 0,6. Em seguida as células foram deixadas em repouso por vinte minutos no gelo, e centrifugadas a 4 °C. As células foram centrifugadas novamente com o mesmo volume de água estéril gelada, e depois com metade do volume de água estéril gelada. Após as lavagens com água, foi realizada uma lavagem com 10 mL de glicerol 10 %. O pellet foi resuspenso em 10 mL de glicerol 10 %. Foram aliquotados 40 µL em eppendorfs e congelados a -80 °C.

###### **2. Manipulação do DNA Plasmidial de bactéria (miniprep)**

Culturas de *E. coli* possuindo o vetor pTrc, e culturas de *E.coli* possuindo o operon pPDO, foram cultivadas em meio LB 2 % com ampicilina 100 µg/mL a 37 °C e a 200 rpm, *overnight*. As células, foram centrifugadas, ressuspensas

em tampão P1(10mM Tris-HCl / 1mM EDTA) e transferidas para um tubo de micro centrifuga. Foi adicionado tampão P2 (0,2mM NaOH / 1 % SDS) e homogeneizou-se. Adicionou-se 350 µL de tampão N3 (Acetato de potássio 3M pH 4,9) e o sistema foi homogeneizado novamente. Centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi adicionado à coluna QIAprep por pipetagem e centrifugado durante 60 segundos. A coluna QIAprep foi devidamente lavada adicionando 0,5 mL de tampão PB (cloridrato de guanidina e isopropanol) e centrifugada por 60 segundos. Novamente a coluna QIAprep foi lavada, adicionando-se 0,75 mL de tampão PE. Centrifugou-se por mais 60 segundos. Em seguida, colocou-se a coluna QIAprep em um tubo de micro centrifuga limpo de 1,5 mL para a eluição do DNA. Adicionou-se, então, 50 µL de tampão EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) e centrifugou-se por 1 minuto (QIAprep Spin – Qiagen).

### 3. Quantificação do DNA:

As amostras de DNA foram quantificadas, através de espectrofotometria, com leitura no comprimento de onda  $\lambda = 260$  nm, no qual o fator era de 50 ng/µL.

### 4. Digestão com enzimas de restrição:

Os DNAs plasmidiais foram extraídos de bactéria através de clivagem com as enzimas de restrição apropriadas *EcoRI* e *SaI* utilizando tampão, temperatura e tempo de digestão fornecidos pelo fabricante. A digestão dos plasmídeos pTrc e pBSK PDO foram realizadas como mostra a Tabela 2, e a digestão dos plasmídeos pBAD PDO e pTrc PDO se encontram na Tabela 3.

**Tabela 2: Protocolo de digestão dos plasmídeos pTrc e pBSK PDO, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SaI*, em banho a 37° C, *overnight***

	1	2	3	4	5	6
pTrc	10	10	10	-	-	-
pBSK PDO	-	-	-	10	10	10
<i>EcoRI</i>	1	-	1	1	-	1
<i>SaI</i>	-	1	1	-	1	1
Tampão: Tango	4	4	4	4	4	4
H <sub>2</sub> O (miliQ)	5	5	4	5	5	4

Os volumes se encontram em µL.

**Tabela 3: Protocolo de digestão dos plasmídeos pBAD PDO e pTrc PDO, com a enzima de restrição *SaI*, em banho a 37° C, *overnight*.**

	DNA: pBAD PDO	DNA: pTrc PDO	<i>SaI</i>	Tampão: Buffer 0	H <sub>2</sub> O (miliQ)
1	10	-	1	2	7
2	-	10	1	2	7

Os volumes se encontram em µL.

##### 5. Eletroforese em gel de agarose (1%)

Os DNAs plasmidiais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, a uma voltagem de 80 V. A eletroforese de DNA foi realizada em TAE 1X (40mM Tris-acetato pH 8,5; 2mM). Ao finalizar a eletroforese, o gel foi corado durante 15 minutos com brometo de etídio e analisado em foto documentador, utilizando lâmpada UV.

##### 6. Extração de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após a eletroforese, os fragmentos de DNA desejados foram cortados do gel e purificados usando sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen): foram adicionados aos fragmentos tampão QG um volume 3 vezes maior do que massa do fragmento, em seguida foram incubados a 50 ° C durante 10 minutos; logo após foi adicionado isopropanol em uma relação volumétrica de 1

para 1; a amostra foi aplicada a coluna QIAquick e centrifugada por 1 minuto, foram adicionados 0,5 mL de tampão QG e centrifugados por 1 minuto, para lavar foram colocados 0,75 mL de tampão PE a coluna e centrifugados por mais 1 minuto; para eluir o DNA foram adicionados, 50 µL de água e centrifugadas por 1 minuto. E em seguida o DNA foi quantificado.

## 7. Transformação

Os plasmídeos sintetizados pTrc/PDO ou pBad/PDO foram utilizados para transformar células de *E. coli* eletro competentes. Essa inserção foi realizada através de um eletroporador. O método da eletroporação consiste na inserção do plasmídeo na célula mediante a um choque elétrico. Para observar o resultado final da transformação as células foram plaqueadas em meio LB 2% sólido, contendo ampicilina, visto que o plasmídeo inserido apresenta como marcador de resistência a ampicilina. Após essa confirmação, as células foram cultivadas em meio LB 2 % e congeladas com glicerol em freezer a -80° C.

## IV. II. (II) Expressão de Proteínas:

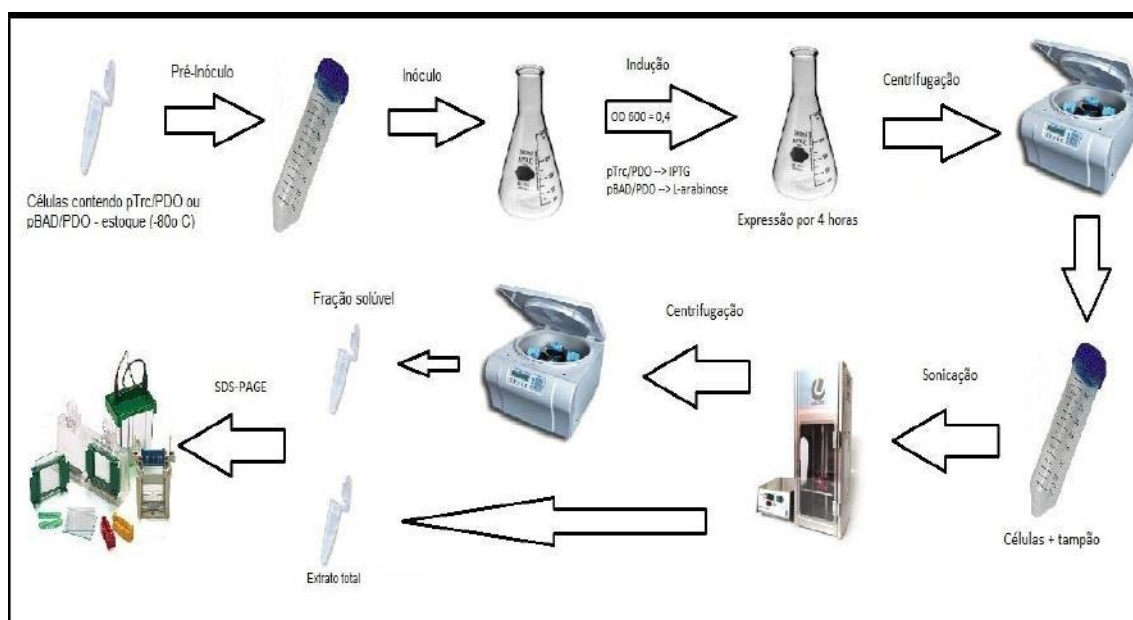
### 8. Expressão de proteína

Foi feito um pré-inóculo com células do estoque, das cepas de *E. coli*: pTrc/PDO e pBAD/PDO, em LB 2 % com ampicilina (100 µg/mL). Esse pré-inóculo foi incubado, *overnight*, a 37 °C e 200 rpm, em frascos de 50 mL. Foi feito um inóculo, em 100 ml de meio de cultivo LB 2% em frascos de 500 mL, de forma que fosse atingido uma D.O. a 600 nm de 0,17. O cultivo foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir uma D.O. a 600 nm de 0,4. Neste ponto, a expressão foi induzida com um mM de IPTG (isopropil-β-Dtiogalactopiranosídeo) (pTrc/PDO) ou 0,2 % L(+) – arabinose (pBAD/PDO) por 4 horas. Foram retiradas uma alíquota antes da indução e outra após a indução, que foram centrifugadas a 10000 rpm e 4 °C durante 20 minutos. Após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em tampão fosfato de sódio 50 mM pH=7. Em seguida o material foi centrifugado novamente, durante 15 minutos, sob as mesmas condições. Foi adicionado lisozima, 1 mg/mL, às amostras e estas foram deixadas em repouso no gelo por 30

minutos. Após resfriadas, as amostras foram sonicadas a 110 V, com amplificação de 30 % (225 W), alternando os pulsos de 10 em 10 segundos. Logo após foi retirada uma alíquota contendo o extrato total, e outra alíquota foi centrifugada por 20 minutos sob as mesmas condições, separando a fração solúvel.

### 9. Eletroforese em Gel de Acrilamida

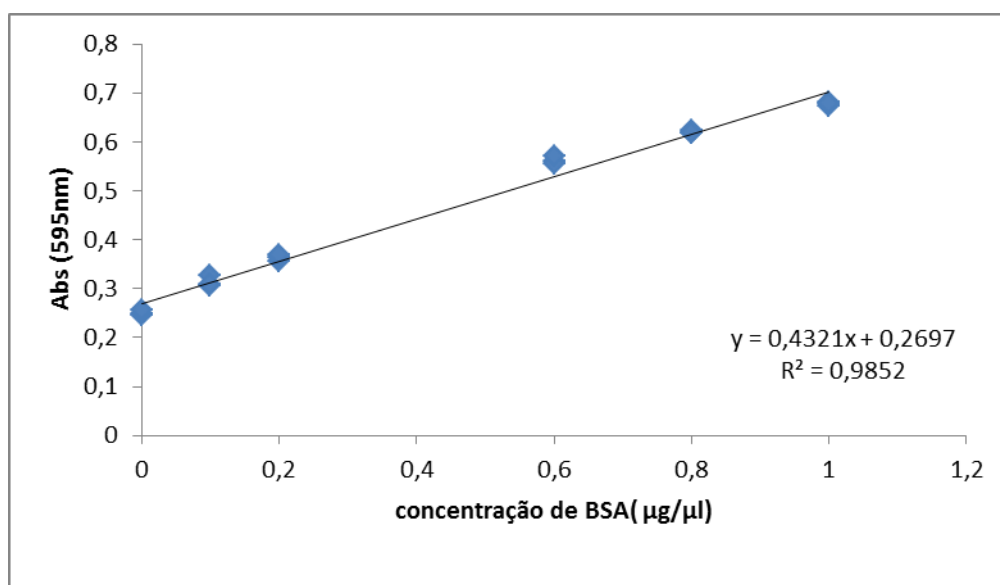
Para avaliar a expressão da proteína foram utilizados precipitados celulares obtidos das amostras de 1 mL retiradas dos cultivos antes (não induzido) e após as 4 horas de expressão. Aos precipitados foi adicionado tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, 10 % de glicerol, 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 2 % de SDS e 0,5 % de azul de bromo fenol, seguindo a razão de 25  $\mu$ L de tampão para cada 0,1 de D.O. a 600 nm. As amostras foram incubadas em banho de água fervente por 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese desnaturante de poliacrilamida com SDS 12,5 % (SDS-PAGE). Foram realizadas corridas a 60 mA e os géis então corados com Coomassie G-250, Blue Silver. Conforme apresentado na Figura 8.



**Figura 8: Representação esquemática do processo de expressão de proteínas.**

### 10. Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada através do método de Bradford, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Bradford, 1976). Para a dosagem de proteínas, serão utilizados 190  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford mais 10  $\mu\text{L}$  da amostra de extrato bruto proveniente da expressão (diluída em água quando necessário) em uma placa de 96 poços, sendo a leitura feita em um espectrofotômetro de micro placas a 595 nm. Como mostra a figura 9.



**Figura 9: Curva analítica de BSA pelo método de Bradford. Concentração de BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) contra abs (595 nm). O coeficiente angular da curva, fator de conversão, é de 0,4321  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .**

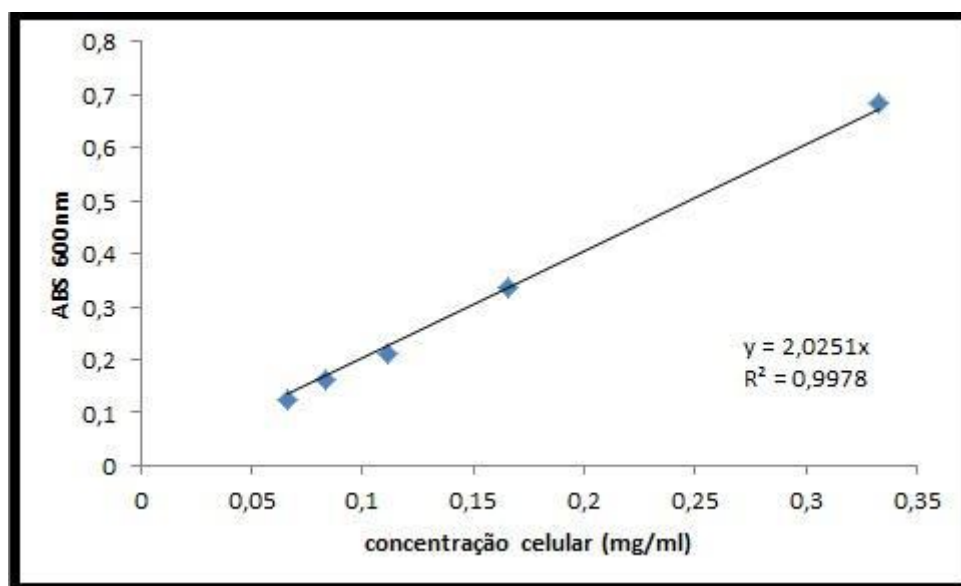
### IV. II. III) Produção de PDO:

#### 11. Massa seca

Uma colônia isolada da cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pBAD/PDO, foi inoculada em 15 mL de meio LB 2% contendo ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a 37° C, 200 rpm, *overnight*. A cultura foi então inoculada em meio de cultivo LB 2% contendo ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de modo que a OD 600 obtida fosse de 0,17. Este meio foi cultivado por 6 horas sendo retirada uma alíquota de 2,0 ml, em seguida esta alíquota foi centrifugada e colocou-se em estufa a 60° C até ser obtido um peso constante de massa seca. A partir da solução mãe foram

realizadas diluições de 2, 5, 10, 15, 20 e 25 vezes, e foram feitas leituras em espectrofotômetro a 600 nm.

Com isso foi traçado um gráfico da absorvância a 600 nm em função da concentração de células em mg/ml e assim obtido através de regressão linear a equação que correlaciona absorvância com concentração de células. O coeficiente angular é de  $2,0251 \text{ (mg/mL)}^{-1}$  e o fator 0,494 mg/mL. Como mostra a Figura 10:



**Figura 10: Curva de concentração celular (mg/mL) x Abs 600 nm para quantificação do crescimento celular a partir do fator.**

## 12. Curva de crescimento

A avaliação do crescimento celular foi realizada através de medidas de Abs 600 nm. Estas leituras foram convertidas para concentração em mg/mL de células através do fator encontrado na curva de massa seca.

## 13. Planejamento Experimental

Para o estudo da produção de PDO, foi realizado um planejamento do tipo Doehlert utilizando como variáveis a concentração de indutor a cinco níveis e a temperatura a três níveis. A Figura 11 mostra um esboço do hexágono formado pela união dos pontos no planejamento do tipo Doehlert e a Tabela 4 apresenta os pontos deste planejamento.



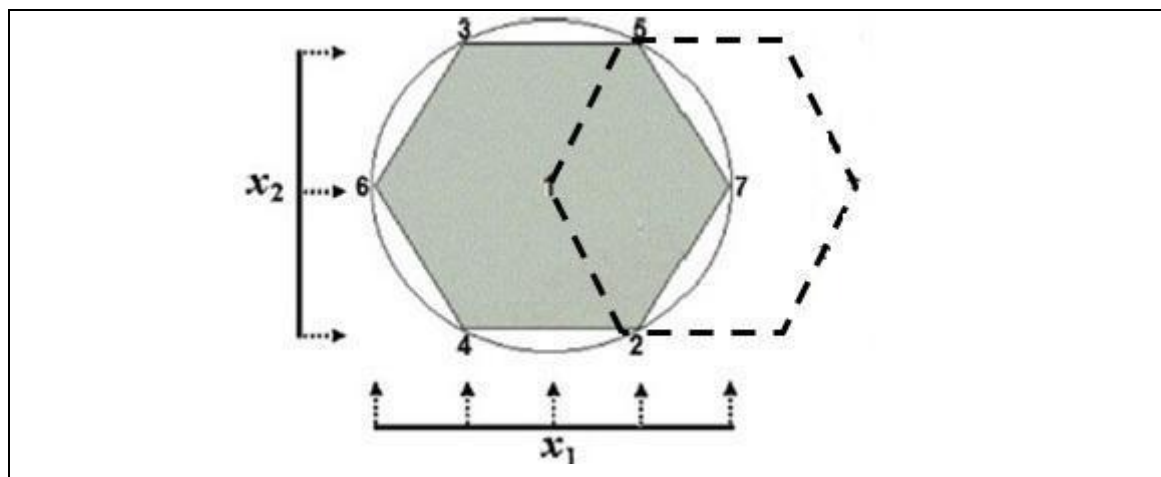


Figura 11: Hexágono relativo à projeção dos pontos em um planejamento experimental do tipo Doehlert utilizando duas variáveis.

Tabela 4: Pontos do planejamento experimental do tipo Doehlert utilizando duas variáveis.

Experimento	Indutor	Temperatura
1	1	0
2	-1	0
3	0,5	0,866
4	-0,5	0,866
5	0,5	-0,866
6	-0,5	-0,866
7	0	0

#### 14. Análise da segregação plasmidial

As condições de cultivo foram as mesmas realizadas no item 15 a seguir; sendo a concentração de arabinose de 0,2 %, a 37 ° C, durante 24 h. A segregação plasmidial foi avaliada através da contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) na presença e ausência de ampicilina (Baheri *et al.*, 2001; Tomazetto *et al.*, 2007). A estabilidade plasmidial foi mensurada através da razão entre o número de colônias da placa com antibiótico (apenas células com plasmídeo) e a contagem de colônias da placa sem antibiótico (total de células presentes). Para realizar-se a contagem do número de UFC, foram feitas diluições seriadas conforme mostra a Figura 12 de modo a serem

contadas aproximadamente 24 colônias na faixa mais diluída, em ambas as placas.

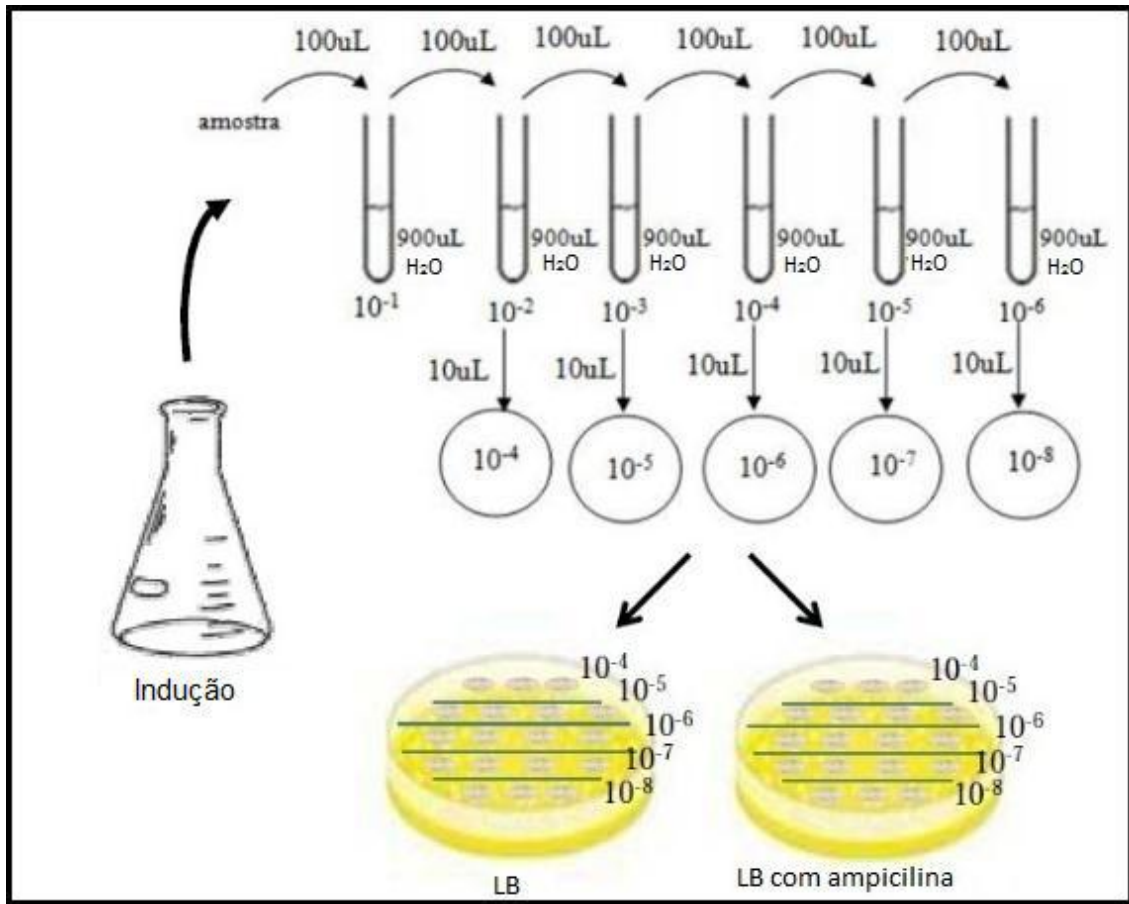
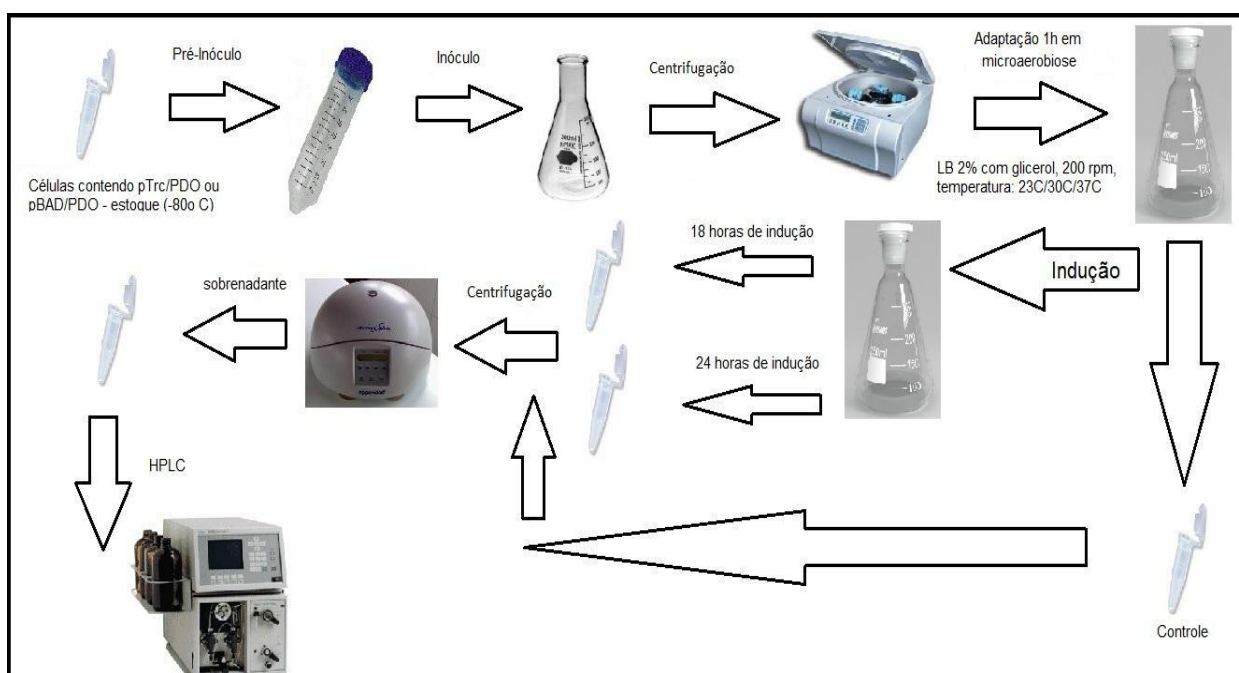


Figura 12: Esquema do procedimento relativo à segregação plasmidial, mostrando após a expressão, as diluições em série, e em seguida o plaqueamento em placa com meio LB sólido, e em meio LB sólido com ampicilina.

### 15. Produção de PDO

Uma colônia isolada da cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pBAD/PDO, foi inoculada em 20 mL de meio LB 2% contendo ampicilina 100 µg/mL a 37 °C e 200 rpm, *overnight*. A cultura foi, então, inoculada em 100 mL de meio de cultivo LB 2 % contendo ampicilina 100 µg/mL de modo que a D.O. a 600 nm obtida fosse de 0,17. Ao atingir uma concentração de aproximadamente 1,5 mg/mL, concentração na qual as células estão em fase estacionária, sem apresentar crescimento celular, foram centrifugadas, ressuspensando o *pellett* em 100 mL de meio de cultivo LB 2 %, contendo glicerol 10 g/L. O sistema foi

vedado e o oxigênio presente foi eliminado com a inserção de N<sub>2</sub>, formando assim uma atmosfera de microaerobiose. O sistema ficou em microaerobiose durante 1 hora para adaptação. Em seguida, foi adicionado o indutor, L(+)-arabinose, nas concentrações equivalentes ao planejamento. Os cultivos foram mantidos a 200 rpm, e sob a temperatura determinada pelo planejamento. Foi retirada alíquota controle (antes da adição do indutor), 18 horas após indução e 24 horas após indução. Essas alíquotas foram centrifugadas a 10.000 rpm e o sobrenadante analisado em HPLC, conforme mostra a Figura 13.



**Figura 13: Representação esquemática da indução de expressão de proteínas e sua análise em HPLC.**

## 16. Dosagem de PDO

As análises para quantificar a produção de PDO foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®). Para realização de tais análises foi utilizada uma coluna Aminex® HPX- 87H, 300 x 7,8mm (Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltd.), detector de IR (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters), software cromatográfico: Breeze. A fase móvel utilizada será H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com vazão de 0,8 mL/min., o

volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e a temperatura da corrida de 60  $^{\circ}\text{C}$ . Os padrões de todos os analitos (Sigma chemical Co, St. Louis, Missouri) foram diluídos em água Milli-Q e injetados em triplicata para a preparação da curva padrão, que relaciona a área obtida no cromatograma com a concentração do composto. Conforme mostra a curva analítica apresentada na Figura 14.

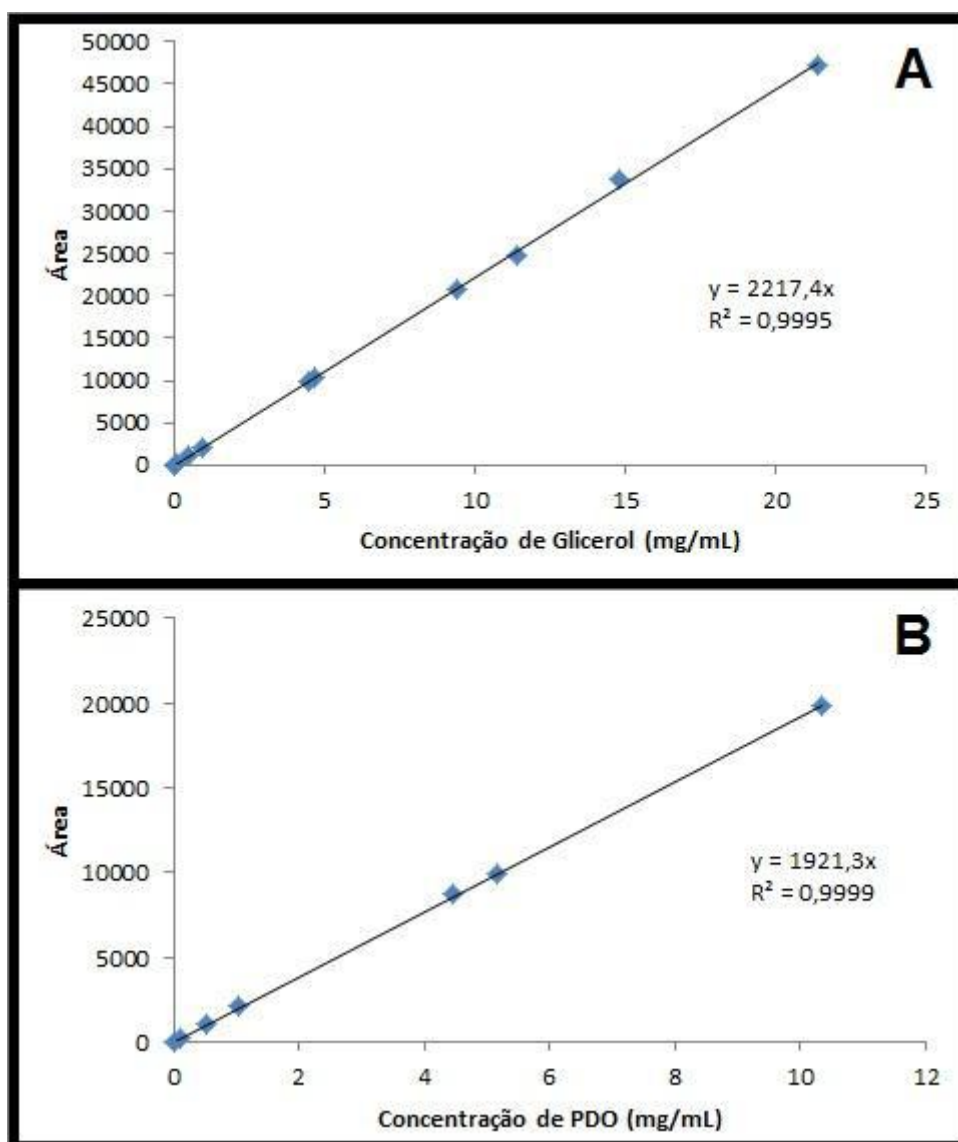


Figura 14: (A) Curva analítica a qual é possível converter a área medida referente ao pico de glicerol no cromatograma em concentração (mg/mL) de glicerol. (B) Curva analítica a qual é possível converter a área medida referente ao pico de PDO no cromatograma em concentração (mg/mL) de PDO.

## V. Resultados e Discussão.

### V.I. Biologia molecular

Para se obter a cepa de *E. Coli* capaz de fermentar glicerol, sem a suplementação de vitamina B12, produzindo 1,3-propanodiol, é necessário introduzir um plasmídeo o qual contenha o operon de *C. butyricum*. A Figura 15 apresenta o operon que contém os genes *dhaB1*, *dhaB2* e *dhaT* que codificam as enzimas glicerol desidratase, ativadora da glicerol desidratase, e 1,3 – propanodiol desidrogenase, respectivamente.

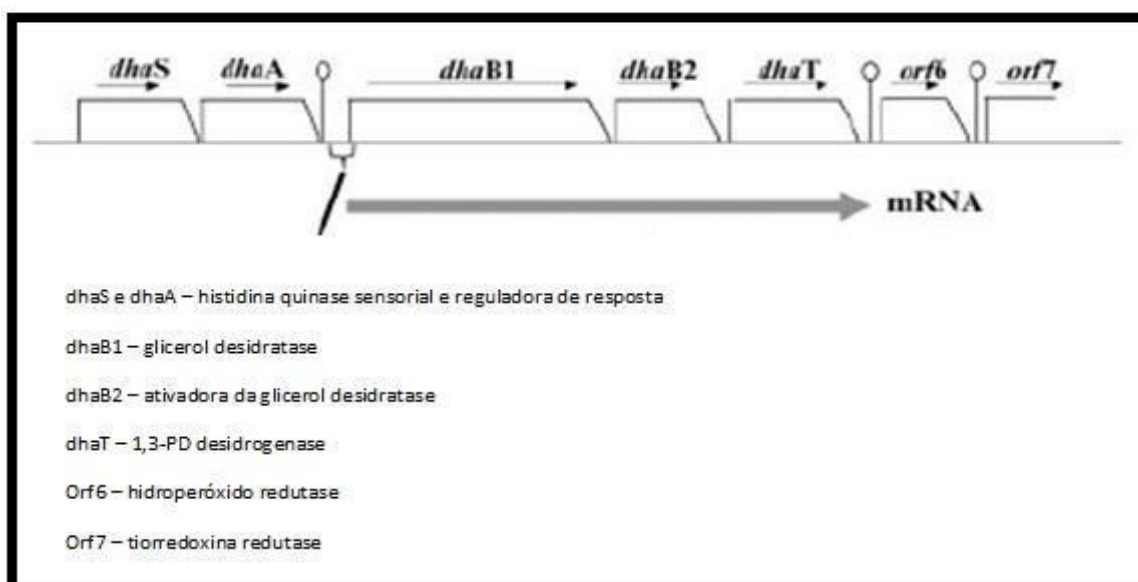


Figura 15: Operon de *C. butyricum* contendo os genes que codificam as enzimas responsáveis pela conversão de glicerol a 1,3-propanodiol: *dhaB1* (glicerol desidratase), *dhaB2* (ativadora da glicerol desidratase), e *dhaT* (1,3 – propanodiol desidrogenase).

Para inserir esse operon em uma cepa de *E. coli* (JM109) inicialmente foi feita a construção de um plasmídeo utilizando os vetores pTrc, Figura 16, e pBSK-PDO, como mostra a Figura 17.

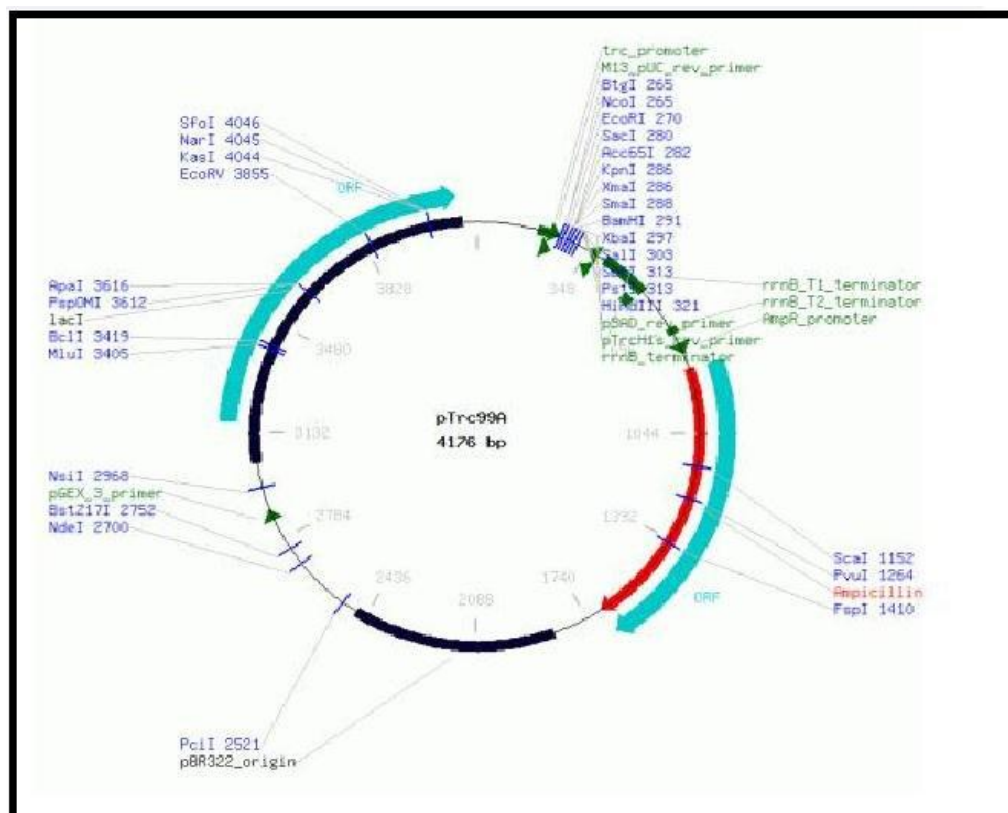
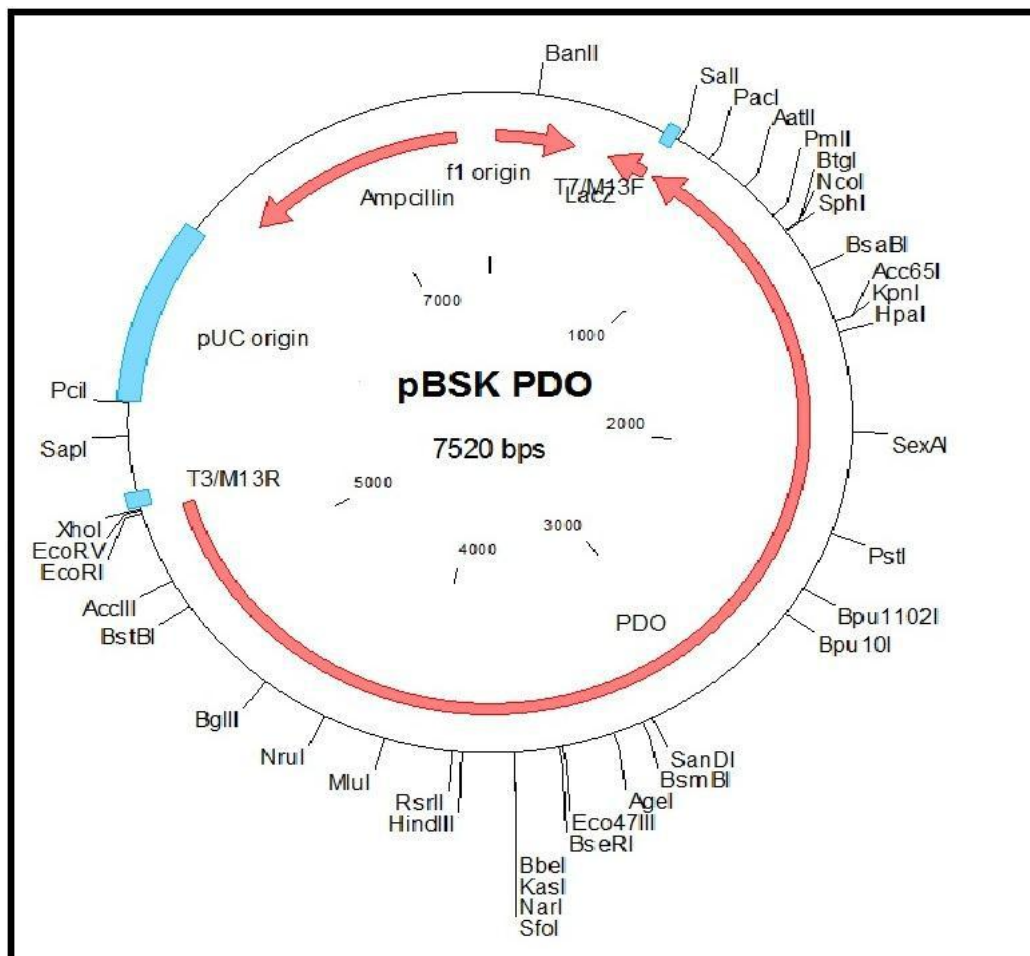


Figura 16: Mapa do plasmídeo pTrc 99 A com tamanho de 4176 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor trc, sendo induzido por IPTG.



**Figura 17:** mapa do plasmídeo pBSK PDO com tamanho de 7520 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor lac, sendo induzido por IPTG.

Em primeiro lugar foi realizada a digestão do vetor pTrc e do inserto pPDO, utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*, como mostra a Tabela 2 no item 4 da seção IV.II.I.

Após a digestão, para confirmar a eficiência das endonucleases de restrição e conseguir selecionar o vetor pTrc (4176 pb) e o inserto de PDO (4500 pb), as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1 %, como mostra a Figura 18, em que no primeiro poço se encontra um padrão de pares de bases e nos poços seguintes os experimentos 1-6 da digestão citada anteriormente.



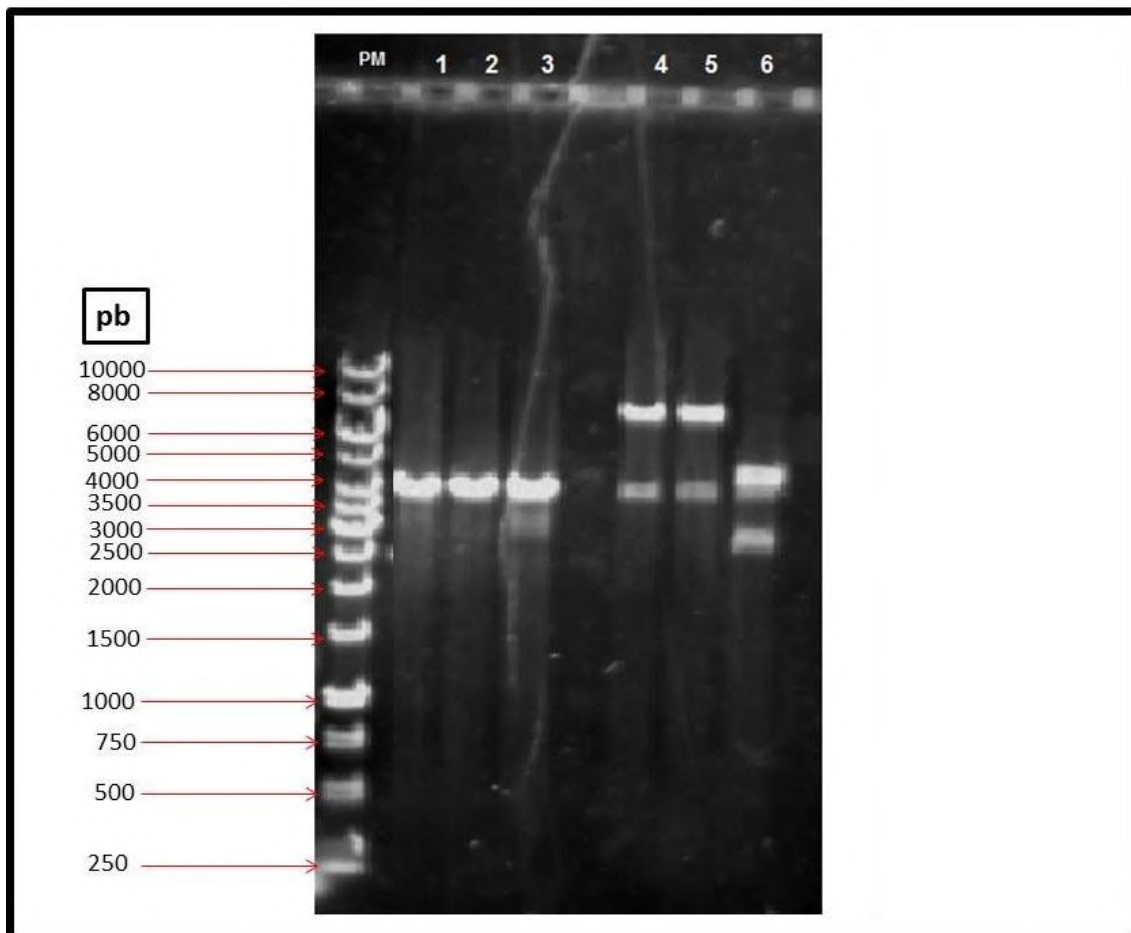


Figura 18: Gel de eletroforese proveniente da digestão de pTrc e pBSK PDO, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*. O gel apresenta o padrão de peso molecular, em seguida o experimento: 1 o qual o vetor pTrc foi digerido apenas com a *EcoRI*, 2 o vetor pTrc foi digerido apenas com a *SalI*, 3 o vetor pTrc foi digerido com ambas as enzimas. Nos experimentos 4, 5 e 6 foram feitas as mesmas digestões, porém, utilizando o vetor pBSK PDO.

Através desse gel, pode-se observar a integridade de ambas as enzimas mostrando que nos poços 1, 2 e 3, há a presença do vetor pTrc (4176 pb) linearizado, visto que nesse plasmídeo os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *SalI* são muito próximos. Nos poços 4 e 5, onde foi utilizada apenas uma das enzimas, o plasmídeo pBSK PDO (7520 pb) não foi linearizado totalmente, restando uma isoforma circular entre 3500 e 4000pb. Quando utilizado as duas enzimas, porém, pode-se observar um fragmento em 4500 pb, relativo ao inserto de PDO, e um próximo a 3000 pb relativa ao vetor pBSK.

A partir desse gel, foram cortadas as bandas referentes ao vetor pTrc e ao inserto de PDO, ambas tratadas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*.



Essas amostras foram purificadas, ligadas utilizando a enzima T4 ligase, e transformadas por eletroporação. Para confirmar a transformação, as amostras foram plaqueadas em meio sólido LB 2 % contendo ampicilina, visto que, o plasmídeo construído oferece resistência a esse antibiótico. No entanto, não foi possível observar crescimento de colônias nas placas, mostrando que a ligação e/ou a transformação não foram bem sucedidas.

A enzima T4 ligase é uma enzima ATP dependente que catalisa a ligação covalente fosfodiéster formada entre as extremidade 5' e 3' de fragmentos de DNA justapostos. Essa enzima tem capacidade de ligar tanto extremidades cegas, como extremidades coesivas, porém esta última apresenta melhor eficácia. Alguns fatores, como a pureza do DNA utilizado, a concentração do inserto e do vetor, e a quantidade da enzima T4 influenciam diretamente na reação de ligação. Outro elemento importante que pode reduzir a capacidade de ligação entre o inserto e o vetor, é a auto-ligação do vetor, esse problema pode ser evitado utilizando vetores com extremidades diferentes (Kandavelou *et al.*, 2005).

Como na eletroporação, pulso elétrico que torna a membrana plasmática momentaneamente permeável para a inserção do DNA, é muito raro apresentar erros, é provável que o problema seja na ligação. Sabe-se que as endonucleases de restrição utilizadas formam extremidades coesivas, evitando assim o auto-anelamento. Também, pode-se descartar a possibilidade de contaminantes provenientes de digestões incompletas, visto que o DNA passou por uma etapa de purificação antes do processo de ligação. O processo de ligação foi repetido algumas vezes alternando a quantidade de DNA, e o tempo de incubação, porém não foi possível observar a clonagem. Provavelmente o problema deve estar na integridade da ligase utilizada em tais experimentos.

Para ultrapassar o obstáculo encontrado e continuar com a linha de pesquisa, mandou-se sintetizar dois vetores contendo o inserto de PDO: pBAD-PDO e pTrc-PDO, como mostram as Figuras 19 e 20. O vetor pBAD-PDO foi sintetizado contendo como indutor a arabinose, produto que apresenta valor mais baixo quando comparado ao indutor utilizado pelo vetor pTrc, IPTG. Sendo assim, os experimentos realizados serão comparados, para analisar

qual dos dois vetores seria economicamente mais viável do ponto de vista industrial, fazendo uma relação entre a produtividade e o consumo de indutor.

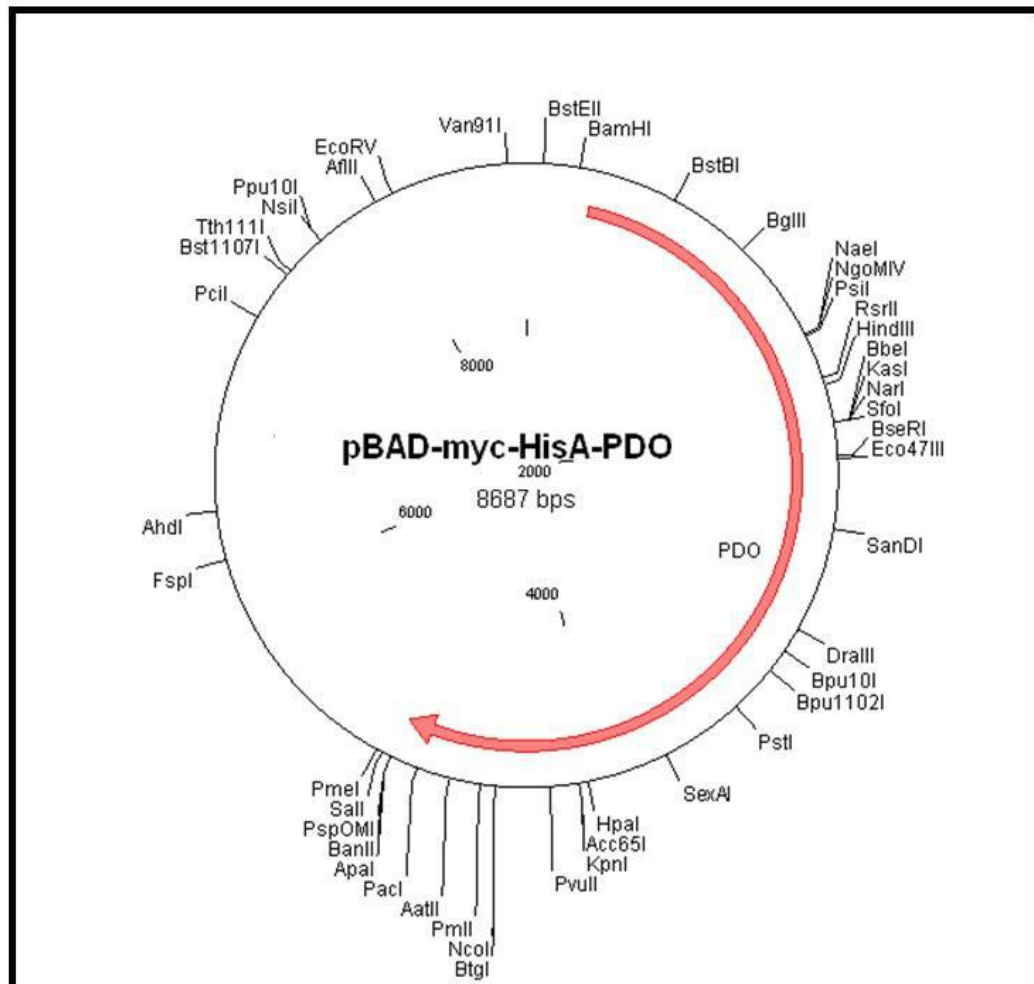
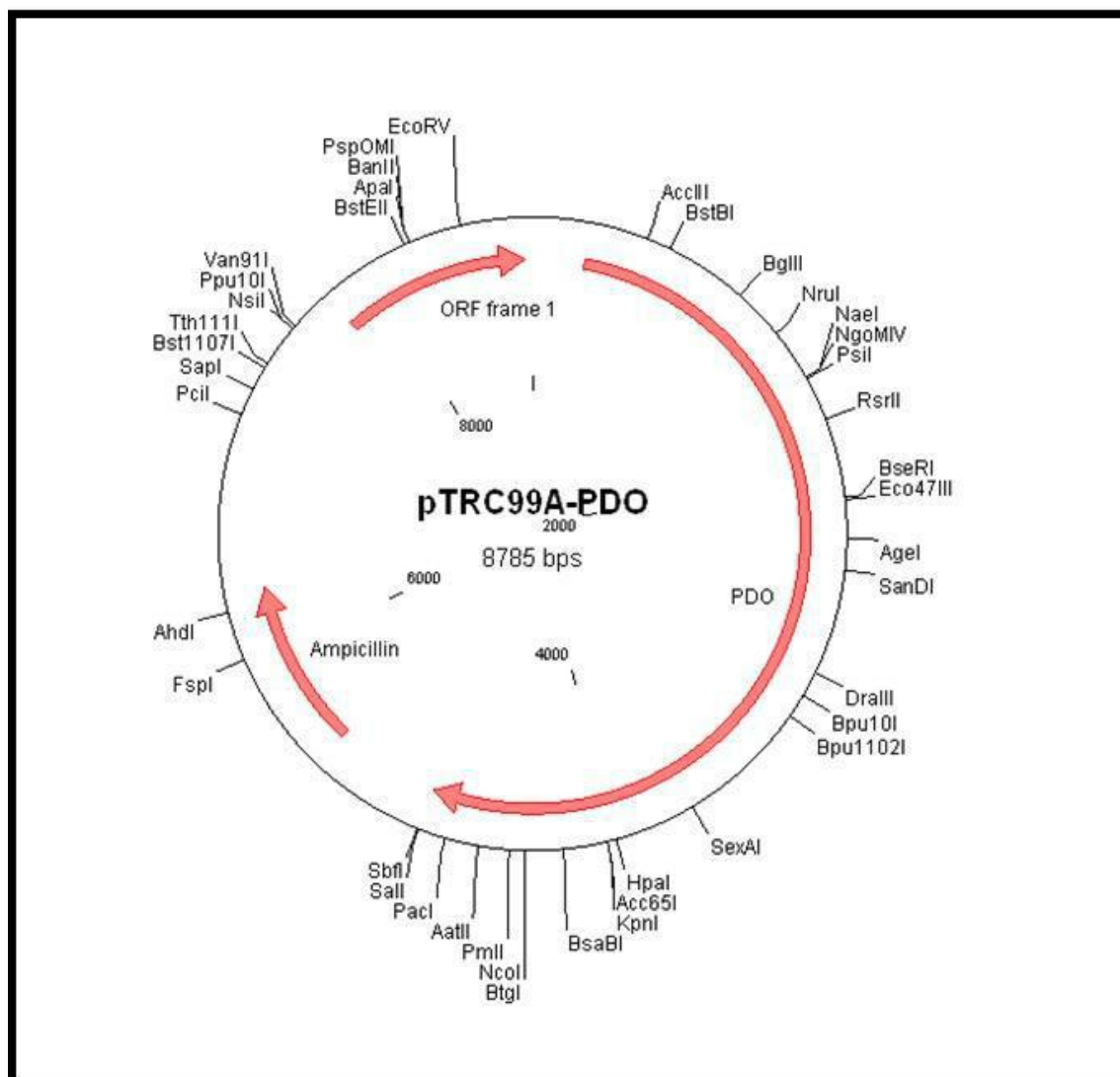


Figura 19: Mapa do plasmídeo pBAD-PDO, com tamanho de 8687 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor lac, sendo induzido por arabinose.

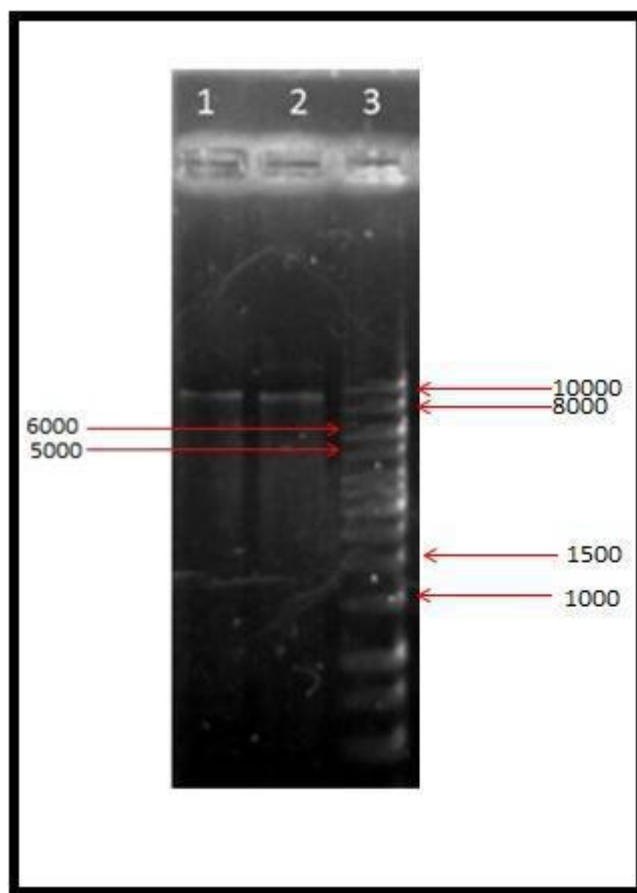


**Figura 20: Mapa do plasmídeo pTRC99A-PDO com tamanho de 8785 pb; marca de seleção ampR, oferecendo resistência à ampicilina; promotor trc, sendo induzido por IPTG.**

Esses plasmídeos foram transformados por eletroporação com células eletro competentes de *E. coli* (JM109). Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB 2 % contendo ampicilina. Desta vez, pode-se observar o crescimento de colônias mostrando a resistência à ampicilina oferecida pelo plasmídeo.

Para confirmar a presença do plasmídeo desejado na cepa de *E. coli*, foi realizada uma digestão, como mostra a Tabela 3 no item 4 da seção IV.II.I., do plasmídeo apenas com a enzima de restrição *SalI*, linearizando-o. Logo após, o

produto dessa digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose como mostra a Figura 21.



**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose da digestão com *SalI* do pBAD-PDO e pTRC-PDO.

Pela eletroforese em gel de agarose (Figura 21), pode-se observar a presença do pBAD-PDO (1) (8687pb) e do pTRC – PDO (2) (8785 pb), comparando-se com o padrão de peso molecular (3). Com isso pode-se afirmar que as cepas de *E.coli* transformadas apresentam os plasmídeos desejados.

A partir desse resultado, pode-se afirmar que o problema encontrado na tentativa anterior de construção do plasmídeo, tenha sido na etapa de ligação, visto que é um momento delicado e limitante, em que para a enzima catalisar a ligação as extremidades heterólogas devem estar justapostas. Além disso, todas as etapas anteriores a ela foram bem conduzidas; e a transformação após a aquisição do plasmídeo novo proporcionou resultados positivos.

## V. II. Expressão de proteína

Depois de se obter uma cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo desejado foi analisada a expressão das proteínas de interesse, nesse caso são três: DhaB1 (glicerol desidratase), DhaB2 (ativadora da glicerol desidratase) e DhaT (1,3-PD desidrogenase). Foi feito um extrato proteico (com proteínas totais (t) e solúveis (s)) e este submetido à eletroforese em gel de acrilamida 12 %, em um cenário de aerobiose, utilizando como indutor arabinose 0,2 %, para o vetor pBAD-PDO, e 1 mM de IPTG para o vetor pTRC-PDO, Figura 22.

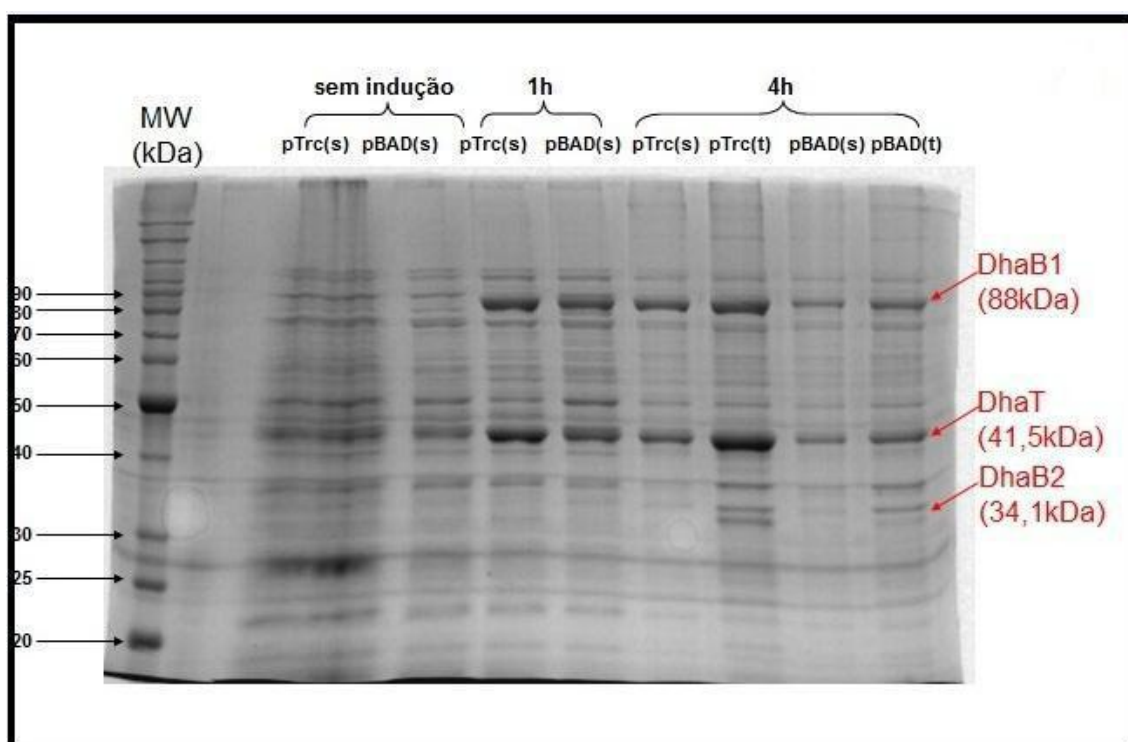


Figura 22: Eletroforese em gel de acrilamida 12%. Indução do pTRC-PDO com 1mM IPTG; pBAD – PDO com 0,2% L(+) arabinose em aerobiose em meio LB 2 %. Pontos: sem indução, 1h de indução e 4 h de indução.

Através da Figura 22, podemos observar, principalmente na fração de proteínas totais, a expressão das proteínas de interesse: DhaB1 (88 kDa), DhaB2 (41,5 kDa) e DhaT (34,1 kDa).

Após observar a expressão das proteínas de interesse, submeteu-se, então, às condições as quais seria realizado o planejamento experimental.

Entretanto foi utilizado outro indutor para o vetor pTRC-PDO, visto que o IPTG é relativamente oneroso e que a indução com IPTG apresenta maior taxa de perda do plasmídeo que aquela feita com lactose (Friebs, 2004). Segundo Woyski e Cupp-Vickery (2001), o IPTG pode ser substituído por lactose em cepas que possuem a enzima  $\beta$ -galactosidase.

A cepa JM109, porém, não possui essa enzima. Com isso o vetor pTRC-PDO foi transformado por eletroporação em células eletro competentes de *E. coli* (BL21), e então, foi possível a utilização de lactose como indutor para o vetor pTRC-PDO. A expressão das proteínas de interesse foi analisada novamente sob uma atmosfera de microaerobiose e na presença de glicerol como mostra a Figura 23.

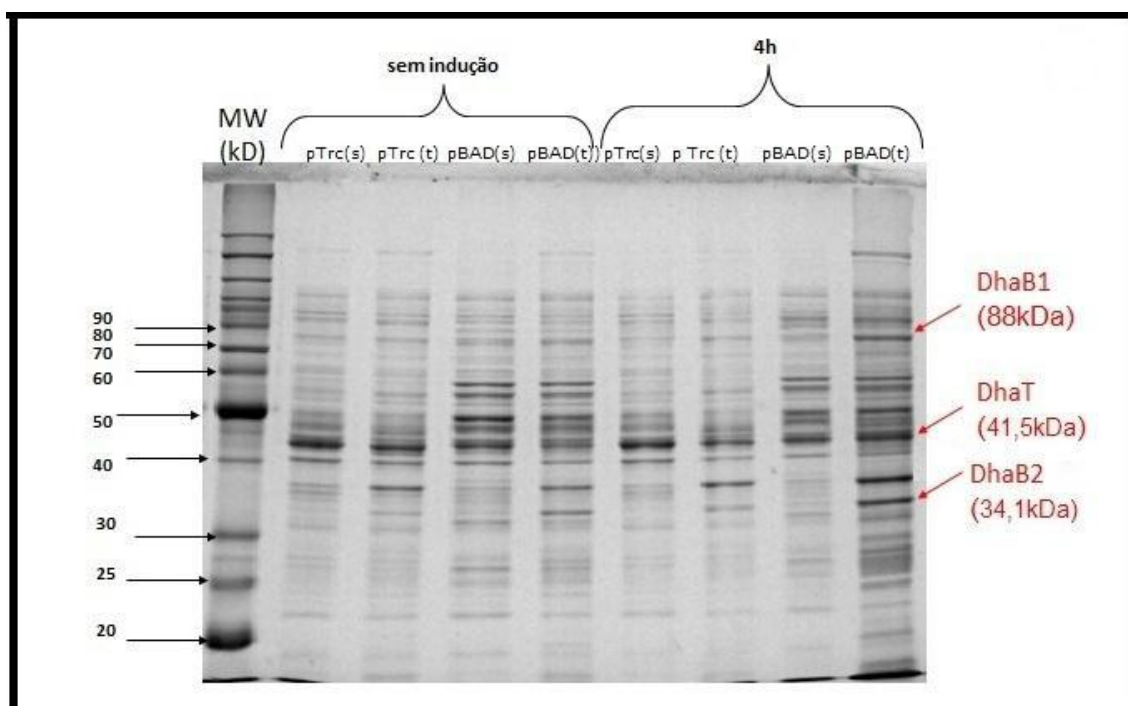


Figura 23: Eletroforese em gel de acrilamida 12 %: Indução do pTRC-PDO com 40 mM lactose; pBAD – PDO com L(+) arabinose em microaerobiose em meio LB 2 % com glicerol. Pontos sem indução e após 4h de indução.

Como a concentração de proteína aplicada a cada poço era a mesma, pode-se observar que após 4 horas de indução, no extrato de proteínas totais, a expressão das proteínas de interesse foi mais evidente na cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pBAD-PDO. Assim, a cepa contendo este vetor, foi escolhida para iniciar os estudos relativos a produção de PDO.

### V.III) Produção de PDO

Para iniciar os experimentos visando escolher melhores condições de temperatura e concentração de indutor foi necessário saber como a cepa escolhida se comporta ao longo do tempo de cultivo. Como o interesse não é o consumo de glicerol para o aumento de biomassa da bactéria, e sim o consumo de glicerol para conversão deste em 1,3-propanodiol, deve-se coletar as células em um ponto próximo a fase estacionária, em que o crescimento celular seja pequeno. Por esse motivo foi construída uma curva de crescimento celular como mostra a Figura 24:

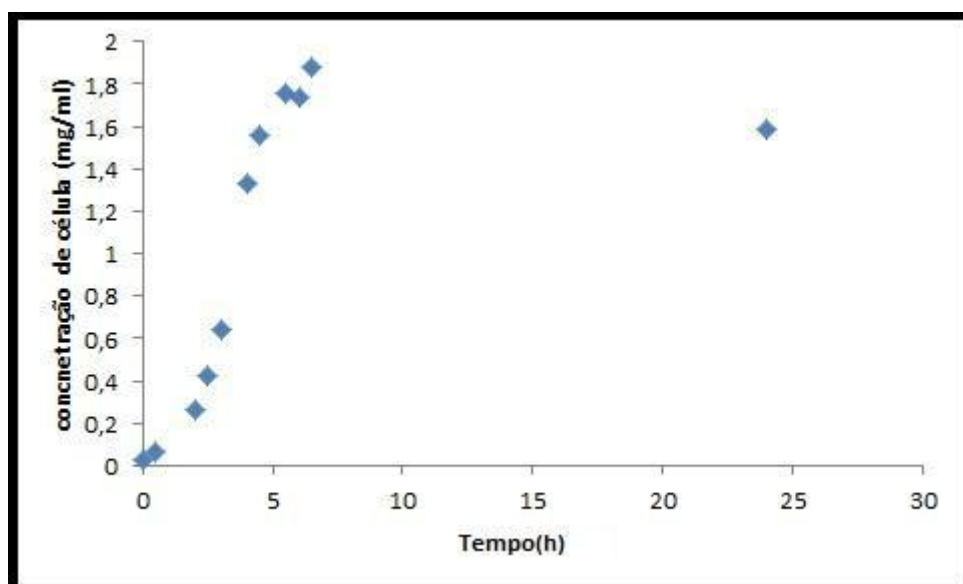


Figura 24: Curva de crescimento celular.

Pode-se observar que a partir de uma concentração de aproximadamente 1,5 mg/mL de célula, não há muita variação na sua concentração, mostrando que as células estão chegando a fase estacionária. Com isso, nos experimentos realizados a seguir, as células foram coletadas em um ponto o qual a concentração celular era próxima de 1,5 mg/ml.

Com a finalidade de estudar a influência do antibiótico e de reduzir os gastos, visando no futuro uma produção de PDO em larga escala, foi realizado um experimento de segregação plasmidial, no ponto do planejamento o qual

apresentava maior concentração de indutor (0,2% arabinose) e maior temperatura (37 °C), pois são sob essas condições que ocorre maior tendência de se verificar segregação plasmidial. O procedimento seguido foi o mesmo descrito no item 15, produção de PDO, na seção I.II.III. Em seguida as células foram plaqueadas após 24 horas de cultivo em meio de cultura LB 2 % contendo ampicilina e sem conter ampicilina.

Ao realizar a contagem das placas, foi observada uma diferença de colônias não significativas, próximas a uma média de 20 colônias por ponto, mostrando que não há segregação plasmidial após a indução. Assim, tornou-se possível a suspensão do uso de antibiótico ao longo da expressão. Eliminando-se o antibiótico como uma variável importante, resta saber qual é a temperatura e a concentração do indutor equivalentes a um ponto de máximo na produção de PDO.

Determinar a importância de uma variável de cada vez, é um processo que consome muito tempo além de não considerar a interação entre elas (Zhang *et al.*, 2006). Desta forma, dando continuidade ao projeto, foi pesquisado um planejamento, o qual, com duas variáveis, fosse possível traçar uma superfície de resposta que apresenta-se um ponto máximo de produção de PDO. O modelo de Doehlert, atualmente é muito utilizado para otimização nas áreas de química analítica, engenharia química e farmácia (Jia, *et al.*, 2012). A otimização, oferece uma vantagem econômica em comparação a outros planejamentos visto que, reduz consideravelmente o número de ensaios a serem efetuados (DiCicco, *et al.*, 2009). Além disso, se o ponto ótimo não se encontrar no domínio escolhido inicialmente, é possível a escolha de um novo domínio, podendo-se aproveitar pontos utilizados anteriormente (Jia, *et al.*, 2012).

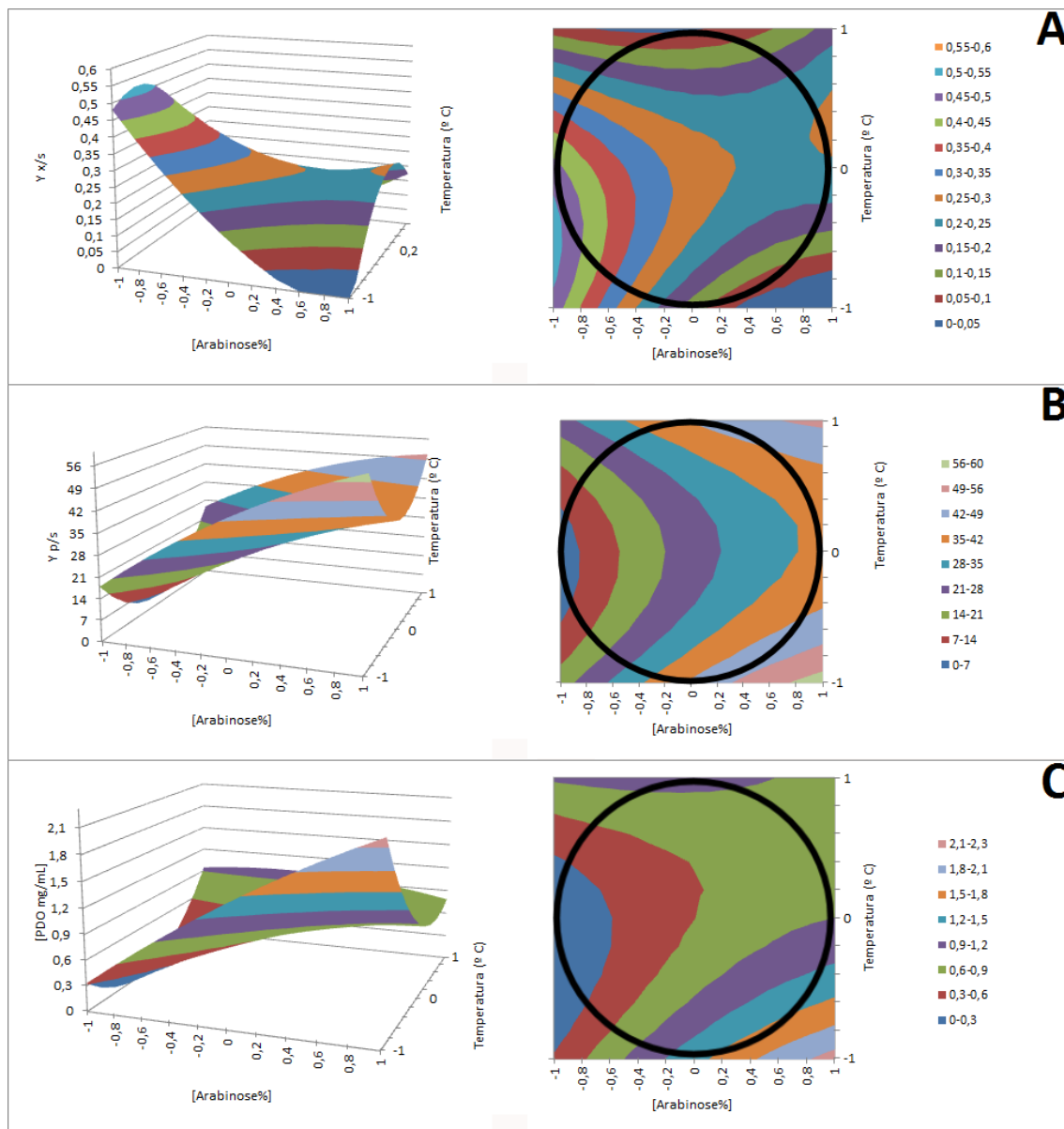
Para finalizar este trabalho foi realizado um planejamento experimental no qual se utilizou como variáveis a concentração do indutor (  $2,00 \times 10^{-5}$  % - 0,20 %) em 5 níveis, e temperatura (23 – 37 °C) em 3 níveis, como mostra a Tabela 5. Como a cepa escolhida para o planejamento foi a cepa de *E. coli* contendo o plasmídio pBAD-PDO, o indutor utilizado foi a L(+)-arabinose.



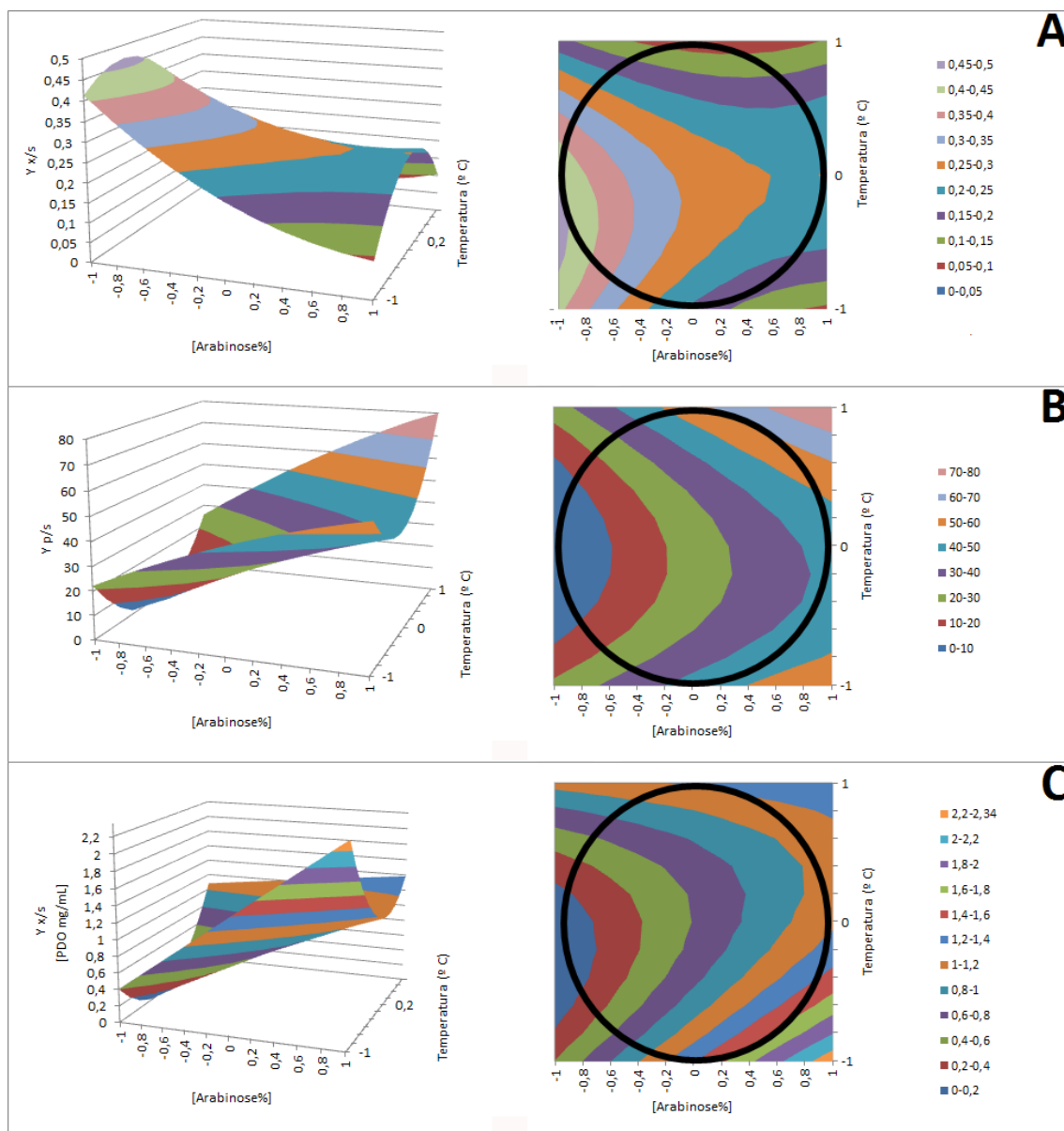
**Tabela 5: Planejamento experimental do tipo Doehlert aplicada a otimização da produção de PDO.**

Experimento	Indutor (%)	Temperatura (°C)
1	0,20	30
2	$2,00 \times 10^{-5}$	30
3	0,15	37
4	0,05	37
5	0,15	23
6	0,05	23
7	0,10	30

Após a expressão de proteínas os sobrenadantes foram coletados, analisados em HPLC, e através de uma curva padrão, a área dos picos referentes ao glicerol e ao propanodiol foram convertidos em concentração g/L. A partir dessas concentrações foram traçados três modelos e suas superfícies de resposta: rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_x/s$ ); rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_p/s$ ); produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  g/L). Como mostram as Figuras 25 (A), 25 (B) e 25 (C), referentes ao ponto de 18 horas; e 26 (A), 26 (B) e 26 (C) referentes ao ponto de 24 horas.



**Figura 25:** Superfícies referentes ao ponto de 18 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{x/s}$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{p/s}$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas.



**Figura 26:** Superfícies referentes ao ponto de 24 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{x/s}$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{p/s}$ ); (C) Produção de PDO (concentração → mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas.

Como pode ser observada nas superfícies apresentadas pelas Figuras 25 e 26, a diferença entre os pontos de 18 horas e 24 horas são muito pequenas, e como calculado com o desvio padrão pode-se afirmar que não há uma diferença significativa. Essas superfícies apresentaram comportamento semelhante ao se variar a temperatura e a concentração de indutor, com isso para experimentos posteriores podemos utilizar apenas o tempo de 18 h.

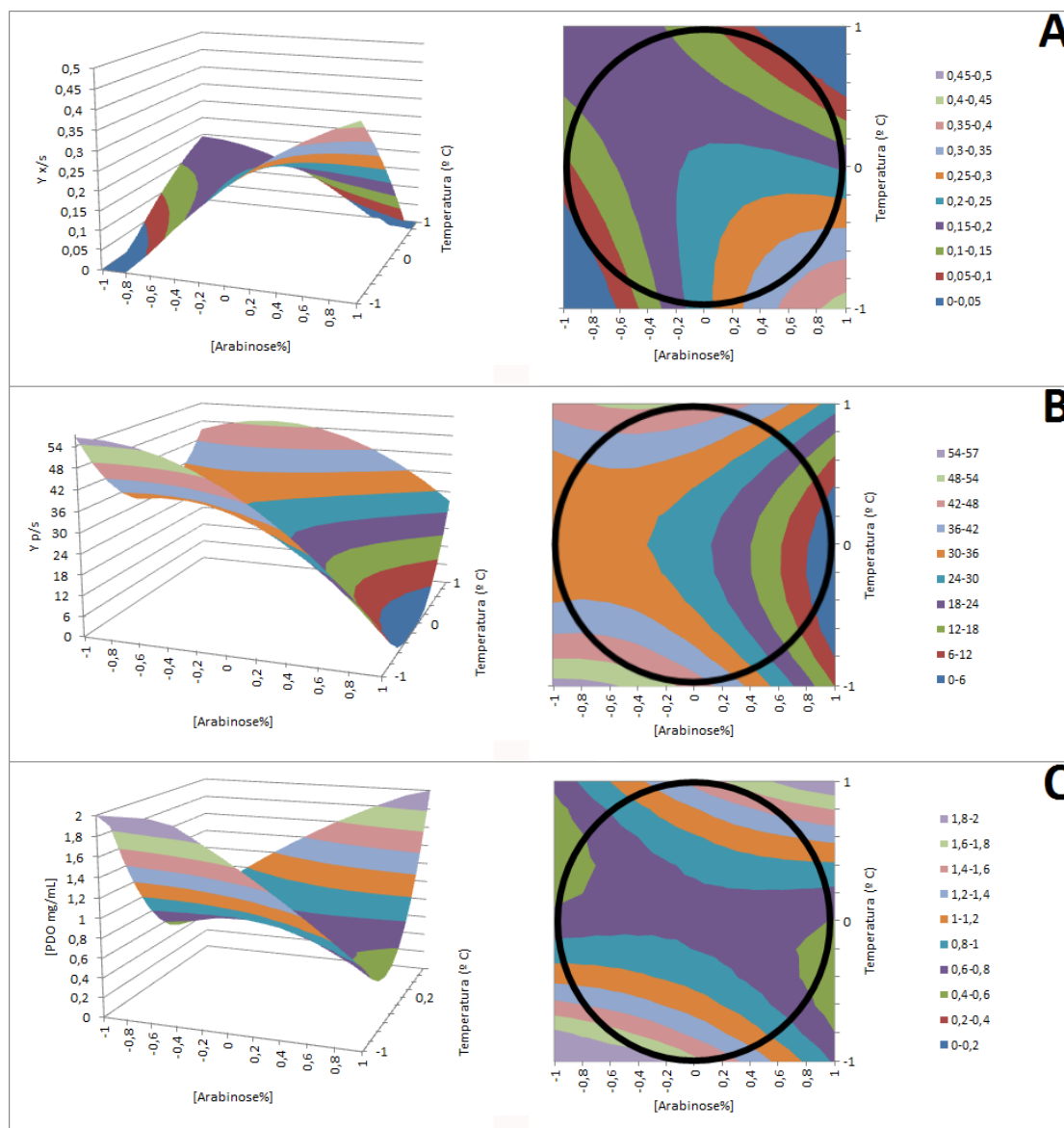
Quando o rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{x/s}$ ) diminui, ocorre um aumento no rendimento de produção de PDO, e em sua concentração, como mostram as Figuras 25 e 26. Assim, pode-se observar que quando há um aumento da biomassa, o consumo do glicerol provavelmente é canalizado para o crescimento celular, e não para produção de PDO. O objetivo desses modelos, além de analisar esse comportamento era de encontrar uma superfície robusta capaz de indicar um patamar em que fosse atingido um rendimento máximo na produção de PDO. O que se pode observar, no entanto, foi que com os pontos escolhidos não há essa superfície robusta incluindo um platô de máximo de rendimento ou produção de PDO, como mostram as Figuras 25 e 26.

Devido a esses resultados foi feito um rebatimento, na horizontal, para a direita, do planejamento proposto anteriormente. Assim, foi realizado um novo planejamento experimental, porém foram realizados apenas três pontos novos, quatro pontos foram reutilizados do planejamento anterior. A Tabela 4 mostra a estratégia do novo planejamento.

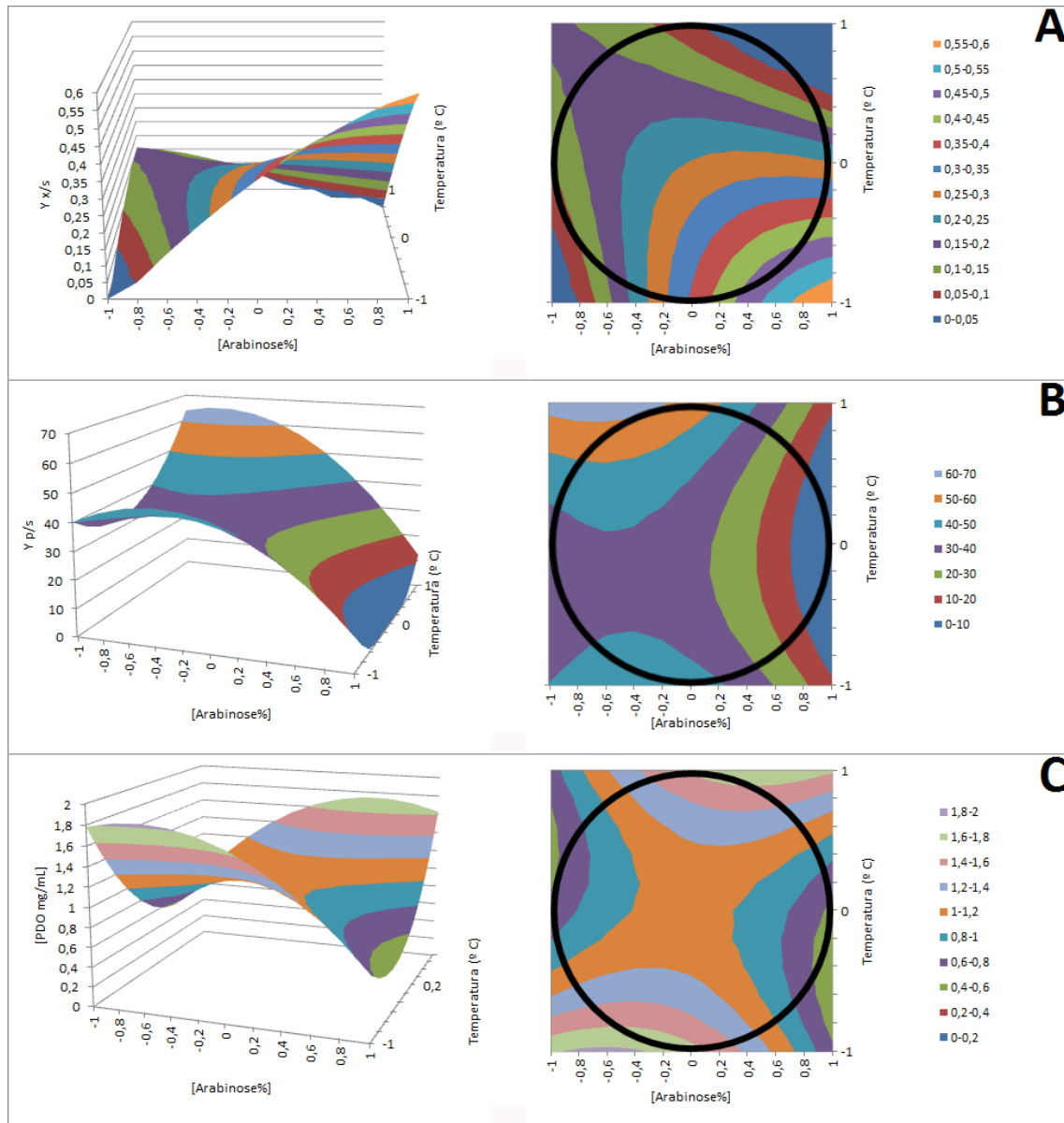
**Tabela 6: Novo planejamento experimental do tipo Doehlert aplicada a otimização da produção de PDO.**

<b>Experimento</b>	<b>Indutor (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>1</b>	0,30	30
<b>2</b>	0,10	30
<b>3</b>	0,25	37
<b>4</b>	0,15	37
<b>5</b>	0,25	23
<b>6</b>	0,15	23
<b>7</b>	0,2	30

Após a realização dos experimentos foram gerados mais três superfícies para o ponto de 18 horas e três para o ponto de 24 horas, como mostram as Figuras 27 e 28. A Tabela 7 apresenta a previsão dos 12 modelos gerados através de uma regressão linear (modelo polinomial).



**Figura 27:** Superfícies referentes ao rebatimento do ponto de 18 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{x/s}$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{p/s}$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas.



**Figura 28: Superfícies referentes ao rebatimento do ponto de 24 horas em relação a: (A) Rendimento de biomassa em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{x/s}$ ); (B) Rendimento (%) da produção de PDO em relação ao consumo de glicerol ( $Y_{p/s}$ ); (C) Produção de PDO (concentração  $\rightarrow$  mg/ml). As variáveis concentração de arabinose e temperatura estão codificadas.**

**Tabela 7: Modelo referente a cada superfície traçada acima (  $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$  ).  $X_1$  é a concentração de arabinose e  $X_2$  é a temperatura.**

Modelo	
<b>18h</b>	
Y x/s	$Y = 0,28 - 0,11X_1 - 0,04X_2 + 0,16X_1X_2 + 0,08 X_1^2 - 0,19 X_2^2$
Y p/s	$Y = 24,50 + 16,58 X_1 - 0,24 X_2 - 4,05X_1X_2 - 4,49 X_1^2 + 18,38X_2^2$
[PDO] mg/mL	$Y = 0,6 + 0,43X_1 - 0,21 X_2 - 0,51X_1X_2 - 0,13 X_1^2 + 0,6X_2^2$
<b>24h</b>	
Y x/s	$Y = 0,28 - 0,1X_1 - 0,06X_2 + 0,06X_1X_2 + 0,06X_1^2 - 0,15X_2^2$
Y p/s	$Y = 24,37 + 22,70X_1 + 6,44X_2 + 4,88X_1X_2 - 3,55X_1^2 + 25,73X_2^2$
[PDO] mg/mL	$Y = 0,61 + 0,56 X_1 - 0,07X_2 - 0,41X_1X_2 + 0,70X_2^2$
<b>18h rebatimento</b>	
Y x/s	$Y = 0,21 + 0,05X_1 - 0,06X_2 - 0,21X_1X_2 - 0,07 X_1^2 - 0,03 X_2^2$
Y p/s	$Y = 25,04 - 15,66X_1 + 1,03X_2 + 6,58X_1X_2 - 10,41X_1^2 + 21,59X_2^2$
[PDO] mg/mL	$Y = 0,75 - 0,04 X_1 - 0,1X_2 + 0,73 X_1X_2 - 0,13 X_1^2 + 0,81 X_2^2$
<b>24h rebatimento</b>	
Y x/s	$Y = 0,25 + 0,07X_1 - 0,15X_2 - 0,25X_1X_2 - 0,07 X_1^2 - 0,04 X_2^2$
Y p/s	$Y = 33,29 - 19,92X_1 + 5,98 X_2 - 5,79 X_1X_2 - 18,24 X_1^2 + 17,38 X_2^2$
[PDO] mg/mL	$Y = 0,93 - 0,06X_1 - 0,02X_2 + 0,51X_1X_2 - 0,32 X_1^2 + 0,72 X_2^2$

O novo modelo confirma a hipótese de um aumento da produção de PDO apenas quando há diminuição da biomassa. Os resultados em relação ao aumento da produção de PDO, porém, ainda continuam sem apresentar uma região (platô) com uma condição estável; visto que o novo modelo continuou sem apresentar uma superfície robusta na região em que se observa o ponto de máximo de rendimento de PDO.

Os resultados obtidos experimentalmente e utilizados para calcular e determinar as superfícies acima, de rendimento de PDO e sua produção se encontram na tabela 8:

**Tabela 8: Resultados de rendimento de PDO e produção de PDO obtidos e calculados, referentes aos pontos de 18h e 24h, e seus rebatimentos.**

			Rebatimento				Rebatimento	
	Rendimento(%)				Produção (mg/mL)			
	18h	24h	18h	24h	18h	24h	18h	24h
1	26,17	33,57	8,36	7,48	0,75	1,06	0,63	0,64
2	13,83	8,07	20,89	22,61	0,19	0,15	0,63	0,56
3	53,90	71,76	25,14	22,11	0,99	1,28	1,49	1,47
4	20,00	24,95	53,90	71,76	0,68	0,86	0,99	1,28
5	57,82	56,39	17,66	16,78	1,79	1,75	1,03	1,05
6	16,90	18,02	57,82	56,39	0,60	0,63	1,79	1,75
7	32,11	28,96	26,17	33,57	0,56	0,56	0,75	1,06
7	20,48	21,53	25,94	35,32	0,63	0,66	0,78	0,93
7	20,89	22,61	23,00	30,97	0,60	0,60	0,73	0,79

Analizando as superfícies de resposta e a Tabela 8, pode-se destacar que o ponto máximo atingido se encontra na borda da superfície e foi relativo ao ponto 5 (experimental) do planejamento que apresenta maior rendimento e produção de PDO, a exceção do rendimento de 24 h que apresentou um maior rendimento no ponto 3, esse valor pode ser atribuído ao erro experimental, mostrando que o ponto mais alto seguinte é referente ao ponto 5. Ao realizar o rebatimento o ponto 6 apresenta melhores condições, porém, sabe-se que ao fazer um novo rebatimento o ponto cinco foi reaproveitado como ponto seis no novo planejamento. Assim, pode-se concluir que em ambos planejamentos o ponto de concentração de PDO máximo encontrado é referente a uma concentração de arabinose 0,15 % a uma temperatura de 23 ° C, no qual obteve-se um resultado de rendimento de aproximadamente de 58 % e uma produção de aproximadamente de 1,75 mg/mL.

Para confirmar a validade do modelo deve-se realizar uma repetição do ponto de concentração máxima do modelo (Jia, *et al.*,2012). Assim, foi realizado, em triplicata, nas condições do ponto 5 do 1º experimento, utilizando a temperatura de 23 ° C e a concentração de 0,15 % de arabinose, durante 18



h. Como resultado, foram obtidas as seguintes concentrações de PDO: 1,42 g/L e 1,64 g/L. Comparando a média desses resultados experimentais com o valor de 1,79 g/L, chega-se a conclusão de que esses valores são iguais com mais de 95 % de probabilidade.

Esse resultado encontrado, comparado ao da literatura é muito baixo. Segundo Zhang e colaboradores ( 2006), foi possível produzir 43,1 g/L de PDO em uma cepa *E. coli* JM109 (pHsh-dhaByqhD) por fermentação em batelada. Tang e colaboradores, atingiram em 2009, uma concentração final de PDO de 104,4 g/L, também utilizando *E. coli* modificada. Essas cepas, porém, foram construídas utilizando genes diferentes, vetores diferentes, sendo termoindutíveis, e os experimentos foram realizados utilizando reator, o que torna mais fácil de controlar as variáveis como temperatura e concentração de induto, além de não se atingir uma atmosfera de anaerobiose requerida.

## VI. Conclusão

---

O operon de *C. butyricum* foi inserido com sucesso em uma cepa de *E. coli* (JM109), tanto através do vetor pTrc, quanto através do vetor pBAD. As cepas mutantes foram capazes de expressar as três proteínas de interesse, DhaB1 (glicerol desidratase), DhaB2 (ativadora da glicerol desidratase) e DhaT (1,3-PD desidrogenase), sendo dispensável a suplementação do meio de cultivo com vitamina B12. A expressão das proteínas de interesse foi mais evidente na cepa mutante contendo o plasmídeo pBAD-PDO. Pode-se observar também que a presença dessas proteínas é visualmente mais efetiva na fração total de proteínas, mostrando que essas não são totalmente solúveis.

Apresentando uma grande vantagem econômica, nota-se que durante a expressão das enzimas não há necessidade de introduzir o antibiótico ampicilina ao meio, pois, como foi observado, não há ocorrência de segregação plasmidial. De acordo com os modelos obtidos a partir do planejamento experimental, pode-se observar que o comportamento seguido pela cepa *E. coli* contendo o plasmídeo pBAD-PDO no ponto de 18 horas e de 24 horas são muito semelhantes, não ocorrendo grande variação na produção de 1,3-propanodiol nas últimas seis horas.

Ao analisar os modelos obtidos, percebe-se que enquanto há crescimento de biomassa o consumo de glicerol é deslocado para esse aumento, e não para a síntese do produto de interesse (1,3-propanodiol). Entre os modelos pode-se observar que não há uma diferença significativa entre os pontos de 18 h e 24 h. O modelo foi validado obtendo-se como ponto de concentração máxima a combinação cuja temperatura é de 23 °C e concentração de arabinose é de 0,15 %.

## VII. Referências bibliográficas

---

Abbad-Andaloussi, S., Amine, J., Gerard, P. e Petitdemange, H. (1998). "Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431". *Journal of Applied Microbiology*, 84: 515-522.

ANP. Disponível em < <http://www.anp.gov.br/?id=472>> , acesso em 05 de Setembro de 2012.

Amaral, P.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C. e Coelho, M.A. (2009). "Glycerol valorization: New biotechnological routes". *Food and Bioproducts Processing*. 87: 179-186.

Arasu, M. V., Kumar, V., Ashok, S., Song, H., Rathnasingh, C., Lee, H. J., Seung, D. e Park, S. (2011). "Isolation and Characterization of the New *Klebsiella pneumoniae* J2B Strain Showing Improved Growth Characteristics with Reduced Lipopolysaccharide Formation". *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 1134-1143.

Araujo, P. e Janagap, S. (2012). "Doehlert uniform shell designs and chromatography". *Journal of Chromatography B*.

Atsumi, S., Cann, A., Connor, M., Shen, C., Smith, K. e Brynildsen, M. (2008). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production". *Metabolic Engineering*, 10: 305-311.

Baheri, H.R., Hill, G.A., Roesler W.J., 2001, "Modelling plasmid instability in batch and continuous fermentors", *Biochemical Engineering Journal*, 8:45-50.

Baneyx, F., (1999), "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 411-421.

Barbirato, F., Himmi, E. H., Conte, T. e Bories, A. (1998). "1,3-propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries". *Industrial Crops and Products* , 7: 281-289.

Biebl, H. (2001). "Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 27: 18–26.

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A-P. e Deckwe, W.-D. (1999). "Microbial production of 1, 3-propanediol". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 289-297.

Bradford, M. M., (1976), "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein – dye Binding". *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 554.

Cao, Y., Xia, Q., Fang, B., (2006), "Optimization of expression of *dhaT* gene encoding 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumonia* in *Escherichia coli* using the methods of uniform design and regression analysis", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 109-112.

DiCicco, M. P., Lang, B., e Harper, T. I., (2009). "Optimization of a novel headspace–solidphase microextraction–gas chromatographic method by means of a Doehlert uniform shell design for the analysis of trace level ethylene oxide residuals in sterilized medical devices." *Biomedical Chromatography*. 23: 647-657 DOI 10.1002/bmc.1170.

Dharmadi, Y., Murarka, A. e Gonzalez, R. (2006). "Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering". *Biotechnology and Bioengineering* , 94: 821–829.

Ferreira, T. F., (2011). "Produção de 1,3-Propanodiol a Partir de Glicerina por Via Biotecnológica". Rio de Janeiro: Proposta de Pesquisa de Tese de Doutorado.

Friebs, K., (2004), "Plasmid Copy Number and Plasmid Stability" *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 86: 47–82.

Graumann, K. e Premstaller, A. (2006). "Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems". *Biotechnology Journal* , 1(2): 164-186.

Gupta, R., Sharma, P. e Vyas, V.V. (1995). "Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*". *Journal of Biotechnology*, 41: 29-37.

Islam, R.S., Tisi, D., Levy, M.S. e Lye, G.j., (2007). "Framework for the rapid optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli* combining microscale experiments and statistical experimental design". *Biotechnology Progress*, 23: 785-793.

Jensen, T. O., Kvist, T., Mikkelsen, M. J., Christensen, P. V., Westermann, P., (2012). "Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *Clostridium pasteurianum*". *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39:709–717.

Jia, X.,Li, H.,Luo, J.,Lu, Q.,Peng, Y.,Shi, L., Liu, L., Du, S., Zhang, G.,Chen, L.,(2012). "Rational design of core–shell molecularly imprinted polymer based on computational simulation and Doehlert experimental optimization: application to the separation of tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge". *Anal Bioanal Chem*, 403:2691–2703.

Kandavelou, K., Mani, M., Reddy, S. P. M. E Chandrasegaran, S., (2005). "Ligation: Theory and Practice", *Encyclopedia of Life Sciences*, DOI: 10.1038/npg.els.0003838

Kaur, G., Srivastava, A. K. e Chand, S. (2012). "Simple Strategy of Repeated Batch ultivation for Enhanced Production of 1,3-Propanediol Using *Clostridium diolis*". *Appl Biochem Biotechnol*, DOI 10.1007/s12010-012-9715-7.

Larentis, A. L., Almeida, R. V., Martins, O. B., Alves, T. L. M., (2006), "Engenharia de Bioprocessos Recombinantes." Escola Piloto Virtual do Programa de Engenharia Química/COPPE.

León, A.D., Islàs, H.J., Cuevas, M.G., Rosa, A. P. B., (2004), "Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum ech42* gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology", *Process Biochemistry*, 39: 2173-2178.

Lo, P.K., Hassan, O., Ahmad, A., Mahadi, N. M., Illias, R. M.,(2007), "Excretory over-expression of *Bacillus* sp. G1 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) in *Escherichia coli*: Optimization of the cultivation conditions by response surface methodology", *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1256-1263.

Maldonado, L.M.T.P., Hernández, V.E.B., Rivero, E.M., Rosa, A. P. B., Flores, J. F., Acevedo, L. G. O., Rodríguez, A. D. L.,(2007), "Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta", *Biomolecular Engineering*, 24: 217-222.

Nakamura, C. E. e Whited, G. M. (2003). "Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol". *Current Opinion in Biotechnology* , 14:454–459.

Nicol, R. W., Marchand, K. e Lubitz, W. D. (2012). "Bioconversion of crude glycerol by fungi". *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:1865–1875.

Nikerel, I.E., Toksoy, E., Kirdar, B. Yildimirim, R.,(2005), "Optimizing medium

composition for TaqI endonuclease production by recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology”, *Process Biochemistry*, 40:1633-1639.

Nikerel, I.E., Öner, E., Kirdar, B. Yildimirim, R., (2006), “Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology”, *Biochemical Engineering Journal*, 32: 1-6.

O'Brien, J., Raynaud, C., Croux, C., Girbal, L., Soucaille, P. e Lanzilotta, W. (2004). “Insight into the Mechanism of the B12-Independent Glycerol Dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary Biochemical and Structural Characterization”. *American Chemical Society*, 43(16): 4635-4645.

Pflügl, S., Marx, H., Mattanovich, D. e Michael Sauer, M. (2012). “1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*”. *Bioresource Technology*, 119: 133–140.

Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C. e Soucaille, P. (2003). “Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*”. *Applied Biological Sciences*, 100: 5010–5015.

Ren, X., Yu, D., Han, S. Feng, Y.,(2006), “Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology”, *Bioresource Technology*, 97: 2345-2349.

Rodrigues, M. I. e Iemma/ A. F., (2005), *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos*, 1ed., São Paulo, Brasil, Editora Casa do Pão.

Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. e Soucaille, P. (2001). “Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures”. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 183: 1748–1754.

Swalley, S.E., Fulghum J.R., Chambers, S.P., (2006), "Screening factors effecting a response in soluble protein expression: Formalized approach using design of experiments", *Analytical Biochemistry*, 351: 122–127.

Tang, X., Tan, Y., Zhu, H., Zhao, K. e Shen, W. (2009). " Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by engineered strain of *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology* , 75(6): 1628-1634.

Terpe, K., (2006), "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 211-222.

Tomazetto, G., Mulinari, F., Stanisçuaski, F. Settembrini, B., Carlini, C. R., Ayub, M. A. Z.,2007, "Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity", *Enzyme and Microbial Technology*, 41:821-827.

Xu, J., Li, W., Wu, J., Zhang,Y., Zheng, Z., Liu, J., Hu, Z., (2006), "Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 780–788.

Walsh, G. (2005). "Therapeutic insulins and their large-scale manufacture". *Applied microbiology and biotechnology* , 67(2): 151-159.

Wang, Y.H., Jing, C.F., Yang, B. Mainda, G.,Dong, M., Xu,A.,(2005). "Production of a new sea anemone neurotoxin by recombinant *Escherichia coli*: Optimization of culture conditions using response surface methodology". *Process Biochemistry*, 40: 2721–2728.



Wilkens, E., Ringel, A. K., Hortig, D., Willke, T., Vorlop, K-D. (2012). "High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a". *Biotechnological Products and Process Engineering*, 93:1057–1063.

Woyski, D. e Cupp-Vickery, J. R. (2001). "Enhanced Expression of Cytochrome P450s from *lac*-Based Plasmids Using Lactose as the Inducer." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 488: 276-280.

Zeng, A-P. e Biebl, H. (2002). "Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends". *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 74: 239-259.

Zhang, X., Li, Y., Zhuge, B., Tang, X., Shen, W., Rao, Z., Fang, H., Zhuge, J., (2006), "Optimization of 1,3-propanediol production by novel recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology", *Journal of Chemical Technology e Biotechnology*, 81: 1075-1078.

Zolgharnein, J., Shahmoradi, A. e Sangi, M. R. (2008). "Optimization of Pb(II) biosorption by *Robinia* tree leaves using statistical design of experiments". *Talanta*, 76: 528–532.

